

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



## TESIS DOCTORAL

### **Células cebadas mucosas y de tejido conectivo esplácnicas en la colestasis extrahepática microquirúrgica experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ana Arias Milla**

Directores

Jaime Arias Pérez  
Valentín Cuervas-Mons Martínez  
María Ángeles Aller Reyero

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGIA**



**CÉLULAS CEBADAS MUCOSAS Y DE TEJIDO  
CONECTIVO ESPLÁCNICAS EN LA COLESTASIS  
EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRÚRGICA  
EXPERIMENTAL**

**Memoria para optar al Grado de Doctor  
presentada por**

**ANA ARIAS MILLA**

**Directores:**

**Prof. Jaime Arias Pérez**

**Prof. Valentin Cuervas-Mons Martinez**

**Prof. María Angeles Aller Reyero**

**TESIS DOCTORAL**

**MADRID, 2013**

*A mi padrino*



# Agradecimientos

- Al profesor Valentin Cuervas-Mons Martinez cuyas enseñanzas tanto en el campo clínico como experimental, han sido fundamentales para elaborar este trabajo y constituirán una indispensable guía en mi carrera profesional.
- A la profesora doctora María Angeles Aller Reyero, por acogerme con tanto cariño y aportar su inteligencia creadora y primorosa sensibilidad.
- Al profesor doctor Jaime Arias por su amor a la verdad, generosidad y humildad, sin límite. Por tan precioso y delicado legado, gracias.
- A Patri Vergara, y Vicente Martínez, Profesores del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, así como al resto de su grupo de Investigación por su colaboración fundamental en la realización de este trabajo experimental.
- A las Profesoras Elena Vara y Cruz García Martín por su inestimable colaboración en la realización de los estudios de biología molecular.
- A Pedro Cuesta y Santiago Cano, expertos en el tratamiento estadístico de los resultados por su inmejorable ayuda.
- A los investigadores y doctorandos que me han antecedido en el estudio de este modelo experimental, ya que me han permitido disponer de numerosa y valiosa información en la elaboración de este trabajo.
- A la Directora del animalario del Hospital Universitario La Paz, de la Universidad Autónoma de Madrid, así como a los técnicos y al personal auxiliar de su equipo.
- A Paula Pinilla, secretaria del departamento de cirugía de la universidad complutense de Madrid, por su gentil disponibilidad e inestimable colaboración administrativa.

- A Matilde Martinez Diaz y Consuelo García Pascual por su continuo interés y ayuda en la realización de los trámites administrativos.

- A María Elena Vicente por la excelente transcripción mecanográfica del manuscrito.

- A Carlos Gilsanz por su infinita paciencia a la hora de enseñarme la técnica quirúrgica y por hacer de aquellas horas un entrañable núcleo de trabajo.

- Al Doctor Manuel Losada por su incondicional disponibilidad y amabilidad

- A Carlos Nieto y Zoe de Julián por haber compartido las tardes de colestasis y formar un gran equipo coordinado.

- A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida y por compartir mi ilusión en aquello por lo que lucho.

- A Santiago Mercader por comprender y compartir de cerca mi esfuerzo como nadie habría sabido hacerlo. Por su enseñanza de actitud ante la adversidad y continua esperanza.

- A mi amiga Adela Martinez por su colaboración en la traducción a la lengua inglesa y su amistad verdadera independiente de la localización geográfica de ambas y del momento vital de nuestros caminos.

- A mi tutora Susana Mellor por su constante interés en mi mejora laboral y por su ejemplo de sacrificio vital y de calidad humana.

## ***Índice de abreviaturas y acrónimos***

## **A**

**AB:** Ácidos biliares

**ANOVA:** Ánalysis de la varianza

**ALP:** Fosfatasa alcalina

## **B**

**B:** Bazo

**BD:** Bilirrubina directa

**BT:** Bilirrubina total

## **C**

**CCl<sub>4</sub>:** Tetracloruro de carbón

**CCR2:** Chemokine receptor 2

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (Calcitonin gen related peptide)

**CM:** Ratras con colestasis microquirúrgica

**CMK:** Ratras con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

**CMQ:** Ratras con colestasis microquirúrgica

**CMQ+K:** Ratras con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén

**CO:** Monóxido de carbono

**CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo (connective tissue growth factot)

## **D**

**D:** Duodeno



**DE:** *Desviación estándar*

**DMSO:** *Dimetil silfóxido*

**DNA:** *Acido desoxirribonucleico*

## **E**

**EGF:** *Factor de crecimiento epitelial (epithelial growth factor)*

**ELISA:** *enzyme-linked immunosorbent assay*

**eNOS:** *Óxido Nítrico sintasa endotelial*

**ER:** *Espleno-renal*

**Eri:** *Colaterales portosistémicas esplenorenales inferiores o caudales*

**Ers:** *Colaterales portosistémicas esplenorenales superiores o craneales*

**ES:** *Estadísticamente significativo*

**ETs:** *Redes extracelulares, extracelular traps.*

## **F**

**FA:** *Fosfatasa alcalina*

## **G**

**GAGs:** *Glicosaminoglicanos*

**GGT:** *Gammaglutamil transferasa*

**GLM:** *Ganglios linfáticos mesentéricos*

**GM-CSF:** *Factor estimulante de colonias macrófago-granulocito*

## **H**

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

**HGF:** Factor de crecimiento hepatocitario

**HIF:** Factor inducible de hipoxia

**HMGB1:** High-mobility group box protein 1

**H<sub>2</sub>S:** Sulfuro de hidrógeno

## **I**

**ICAM-1:** Molecula de adhesión leucocitaria 1

**IFCC:** International Federation for Clinical Chemistry

**IFN-γ:** Interferón Gamma

**IGF:** Insuline-like growth factor

**IL:** Interleuquinas

**iNOS:** Oxido nítrico sintasa inducible

**ΔPC:** Incremento de peso corporal

**IP-10 / CXCL10:** Proteína 10 inducible por interferón

## **L**

**LBP:** Lypopolisacaride-binding-protein

**LC:** Lobulo caudado

**LDH:** Lactato Deshidrogenasa

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (*Light Density Lipoprotein*)

**LK:** *Riñón izquierdo*

**LLD:** *Lobulo lateral derecho*

**LLI:** *Lobulo lateral izquierdo*

**LM:** *Lobulo medio*

**LPS:** *Lipopolisacárido*

**LRV:** *Vena renal izquierda*

**LSR:** *Glándula suprarrenal izquierda*

## **M**

**MAPK:** *ERK-mitogen-activated protein kinase*

**MCP-1:** *Proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (Monocyte chemoattractant protein 1)*

**MDC:** *Quimioquina derivada de los macrófagos (macrophage-derived chemokine)*

**MIF:** *Factor inductor de macrófagos*

**MIG/CXCL9:** *Monoquina inducida por interferón  $\gamma$  (monokine induced by IFN- $\gamma$ )*

**MMP:** *Metaloproteasas de la matriz tisular*

**mRNA:** *Acido ribonucleico mensajero*

## **N**

**Na:** *Sodio*

**NAD<sup>+</sup> y NADH:** *Nicotinamida adenina dinucleótido*

**NF- $\alpha$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ :** *Complejo regulador transcripcional de NF $\alpha$ B.*

**NF- $\kappa$ B:** Factor de transcripción

*Nuclear kappa B*

**NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ :** Complejo regulador transcripcional de

*NF- $\kappa$ B*

**NO:** Oxido nítrico

**NK cells:** Células asesinas naturales

**P**

**P:** Pancreas

**PAF:** Factor de activación plaquetario

**PAR:** Receptores activados de proteinasas

**PC:** Peso corporal

**PE:** Peso esplénico

**PH:** Peso hepático

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

**PGI<sub>2</sub>:** Prostaciclina

**P.O:** Post-operatorio

**PP:** Presión portal

**PR:** Colaterales pararrectales

**PSO:** Ratas pseudo-operadas

**PSO+ K:** *Ratas pseudo-operadas con Ketotifen*

**PT:** *Peso testicular*

## **S**

**S:** *Bazo*

**SCF:** *Stem cell factor*

**SO:** *Ratas Pseudoperadas*

**SO+K:** *Ratas Pseudoperadas tratadas con ketotifén*

## **R**

**RANTES:** *Regulated on activation of normal T cells-expressed and secreted protein*

**RMCP-I:** *Rat mast cell proteinase I*

**RMCP-II:** *Rat mast cell proteinase II*

**ROS:** *Especies reactivas de oxígeno*

## **T**

**TGF- $\beta_1$ :** *Factor de crecimiento transformador  $\beta_1$  (Transforming growth factor)*

**TIMP-1:** *Inhibidores tisulares de las MMPs*

**TLR:** *receptores Toll-like*

**TNF $_{\alpha}$ :** *Factor de necrosis tumoral alfa*

## **V**

**VCAM:** *Molécula de adhesión celular vascular*

**VE:** *Vena esplénica*

**VEGF:** *Vascular endothelial Growth factor*

**VLDL:** *Lipoproteínas de muy baja densidad (Very Light Density Lipoprotein)*

**VVM:** *Vasculopatía venosa mesentérica*

## ***ÍNDICE GENERAL***

**RESUMEN/ABSTRACT.....**

**SUMMARY.....**

**I. INTRODUCCIÓN..... 1**

1.COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA Y RESPUESTA INFLAMATORIA..... 2

2.MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS  
EXTRAHEPÁTICA..... 7

3.ALTERACIONES FISIOPATOLÓGICAS EN LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA  
EXPERIMENTAL .....14

4.LAS CÉLULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS .....22

5.KETOTIFÉN: UN FÁRMACO ESTABILIZADOR DE LAS CÉLULAS CEBADAS .....34

**II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ..... 40**

**III. MATERIAL Y METODOS ..... 43**

1.MATERIAL .....44

1.A.ANIMALES .....44

1.B.INSTALACIONES .....44

1.B.1.Animalario .....44

1.B.2.Unidad de microcirugía .....45

1.B.3.Sala de sacrificio y procesamiento de muestras .....45

1.B.4.Área de conservación de muestras.....46

1.B.5.Eliminación de residuos biológicos .....46

1.C.FÁRMACOS.....46

1.C.1.Anestésicos.....46

1.C.2.Ketotifén .....47

1.C.3.Otros fármacos .....47

1.D.MATERIAL .....47

1.D.1.Instrumental quirúrgico .....47



1.D.1.A.Pinzas .....	47
1.D.1.B.Porta agujas Mayo-Hegar de 12,7 cms.....	48
1.D.1.C.Tijeras .....	48
1.D.2.Material de sutura y ligadura.....	48
1.D.3.Material quirúrgico complementario .....	48
1.D.4.Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras.....	49
1.D.5.Material de laboratorio .....	49
1.E.EQUIPOS DE LABORATORIO .....	50
1.E.1.Procesado de muestras.....	50
1.E.2.Estudios bioquímicos en suero y líquido ascítico .....	50
1.E.3.Determinación de niveles de mediadores inflamatorios en hígado, íleon y gánglios linfáticos mesentéricos .....	50
1.E.4.Estudio del recuento de células cebadas mucosas y conectivas esplácnicas	50
1.F.REACTIVOS DE LABORATORIO.....	51
1.F.1.Estudios bioquímicos en suero .....	51
- Bilirrubina total y directa .....	51
- Ácidos biliares .....	51
- Fosfatasa alcalina .....	51
- Proteínas totales.....	51
1.F.2.Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) e interleuquina (IL-13) en líquido ascítico .....	52
- Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) .....	52
- Interleuquina 13 (IL-13).....	52
1.F.3.Niveles de citoquinas en tejidos esplácnicos.....	52
1.F.4.Valoración de células cebadas mucosas y conectivas esplácnicas.....	53
1.F.4.A.Valoración de células cebadas mucosas (RMCP-II).....	53
1.F.4.B.Valoración de células cebadas conectivas (RMCP-I) .....	53
2.MÉTODOS .....	54

2.A.CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES .....	54
2.B.DISEÑO EXPERIMENTAL .....	54
2.C.TÉCNICA ANESTÉSICA.....	56
2.D.TÉCNICA QUIRÚRGICA DE PSEUDO-OPERACIÓN.....	57
2.E.TÉCNICA DE COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRÚRGICA .....	58
2.F.MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO .....	63
2.G.SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.....	65
2.H.DESARROLLO DE ASCITIS Y CIRCULACIÓN COLATERAL ESPLÉNORRENAL .....	66
2.I.VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA .....	67
2.J.BIOQUÍMICA SANGUÍNEA .....	69
- Bilirrubina total y directa .....	70
- Ácidos biliares .....	71
- Fosfatasa alcalina .....	71
- Proteínas totales.....	71
2.K.MARCADORES INFLAMATORIOS EN LÍQUIDO ASCÍTICO .....	72
- Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) .....	72
- IL-13 .....	72
2.L.DETERMINACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS ESPLÁCNICOS.....	72
2.L.1.Homogeneización de los tejidos .....	72
2.L.2.Valoración de proteína quimiotáctica de macrófagos, TNF alfa, IL-10 e IL-13 .....	73
2.L.3.Determinación de los niveles tisulares de proteínas .....	73
2.M.ESTUDIO DEL RECUENTO DE CÉLULAS CEBADAS MUCOSAS Y CONECTIVAS ESPLÁCNICAS.....	74
2.M.1.Células cebadas mucosas .....	74
2.M.2.Células cebadas de tejido conectivo.....	75
2.N.ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	76
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>

1.SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS.....	78
2.HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN LA NECROPSIA.....	79
3.EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL .....	81
4.PESO HEPÁTICO .....	82
5.PESO ESPLÉNICO .....	84
6.PESO TESTICULAR .....	85
7.CIRCULACIÓN COLATERAL ESPLENORRENAL .....	87
8.VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA .....	87
9.ASCITIS .....	89
10.BIOQUÍMICA SANGUÍNEA .....	92
- Bilirrubina total y directa .....	92
- Ácidos biliares .....	93
- Fosfatasa alcalina .....	94
- Proteínas totales.....	95
11.ESTUDIO DE MEDIADORES INFLAMATORIOS ESPLÁCNICOS.....	96
- MCP-I.....	96
- TNF alfa .....	98
- IL-10 .....	100
- IL-13 .....	102
12.ESTUDIO DEL RECUENTO DE CÉLULAS CEBADAS MUCOSAS Y CONECTIVAS ESPLÁCNICAS.....	104
- Hígado .....	104
- Bazo.....	106
- Ganglios linfáticos mesentéricos.....	108
- Íleon .....	110
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>113</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>135</b>

# RESUMEN

**Introducción:** La colestasis extrahepática se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito. Desde el punto de vista bioquímico cursa con niveles séricos elevados de bilirrubina, ácidos biliares, fosfatasa alcalina, gamma-glutamyl transferasa e hipercolesterolemia. En el parénquima hepático la colestasis produce fibrosis/cirrosis biliar, que causa insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal. Para el estudio de esta patología se utiliza principalmente, el modelo experimental de ligadura y sección del colédoco, en la rata. Sin embargo, este modelo experimental evoluciona con complicaciones secundarias a la formación de un pseudoquistes biliar, con colangitis, abscesos hepáticos, pulmonares y sepsis. Para reducir estas complicaciones se ha propuesto como modelo alternativo la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática en la rata, que causa fibrosis biliar, insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal con circulación colateral portosistémica.

**Hipótesis y Objetivos:** La patología esplácnica secundaria a la ictericia obstructiva, se considera que posee naturaleza inflamatoria y, en particular, se sospecha que las células cebadas participan en su patogenia. Por esta razón, en el presente trabajo experimental, se ha utilizado el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata para estudiar la implicación de las células cebadas de tipo mucoso y de tejido conectivo en la patología esplácnica, así como su respuesta al tratamiento con el fármaco estabilizador de células cebadas, Ketotifen.

**Material y Métodos:** En éste trabajo se han utilizado ratas Wistar macho con pesos corporales oscilantes entre 215 y 335 gramos. Los animales se han distribuido aleatoriamente para su estudio en 4 grupos: 1.-Ratas pseudooperadas (SO) a las que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática.; 2.-Ratas a las que se les ha realizado colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ), consistente en la resección de la vía biliar extrahepática; 3.-Ratas pseudooperadas a las que se les ha administrado ketotifen (SO + K) desde las 24 h antes de la intervención hasta el

sacrificio a las 8-9 semanas del postoperatorio y ;4.-Ratas con colestasis microquirúrgica a las que se les administra ketotifen en el mismo periodo ( CMQ + K). En estas series se han realizado las siguientes determinaciones séricas: bilirrubina, ácidos biliares, fosfatasa alcalina y proteínas totales. En líquido ascítico se han determinado IL-13 y de péptido regulador del gen calcitonina (CGRP). Se han determinado en tejidos espláncnicos la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1), TNF-alfa, IL-10 e IL-13. Así mismo, se han determinado las poblaciones de células cebadas mucosas y de tejido conectivo en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon.

**Resultados:** Las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica a las 8-9 semanas de evolución postoperatoria presentan ictericia, hepato-esplenomegalia, ascitis, circulación colateral portosistémica, vasculopatía venosa mesentérica e hipogonadismo. Asimismo, sufren incremento de las concentraciones séricas de bilirrubina ( $p<0.001$ ), ácidos biliares ( $p<0.001$ ) y fosfatasa alcalina ( $p<0.001$ ), en tanto que disminuye la concentración de proteínas totales ( $p<0.001$ ). Las concentraciones de IL-10, IL-13 y MCP-1 aumentan en el íleon y en el parénquima hepático ( $p<0.001$ ). Las concentraciones de factor tumoral de necrosis (TNF- $\alpha$ ) aumentan en el íleon. En el líquido ascítico aumentan las concentraciones de IL-13 y CGRP. Respecto a las subpoblaciones de células cebadas en los animales colestásicos, se produce un incremento hepático, intestinal y esplénico de células cebadas tanto de tipo mucoso como de tejido conectivo ( $p<0.05$ ). En los ganglios linfáticos mesentéricos se observó un incremento de las células cebadas de tejido conectivo ( $p<0.05$ ).

La disminución de peso corporal se asoció a la disminución de peso hepático, esplénico y testicular. En las ratas colestásicas que fueron tratadas con Ketotifen, se produjo una disminución de las concentraciones séricas de bilirrubina ( $p<0.001$ ) y ácidos biliares ( $p<0.001$ ) y aumento de la proteinemia ( $p<0.05$ ). Sin embargo, Ketotifen reduce las concentraciones espláncnicas de TNF- $\alpha$  ( $p<0.05$ ), así como las de IL-13 ( $p<0.01$ ) y CGRP ( $p<0.001$ ) en el líquido ascítico. Este fármaco consigue reducir la presión portal de las ratas con ictericia obstructiva, pero aumenta el grado de circulación colateral portosistémica. No se observaron modificaciones significativas en el número de células cebadas de tipo mucoso y de tejido conectivo en hígado e intestino, en los animales

tratados con Ketotifen, respecto a los animales colestásicos sin tratamiento. Sin embargo, las ratas colestásicas tratadas con Ketotifen sufrieron un significativo incremento del número de células cebadas tanto de tipo mucoso como de tejido conectivo en los ganglios linfáticos mesentéricos ( $p < 0.05$ ).

**Conclusión:** En el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, a las 8-9 semanas de evolución postoperatoria, se produce fibrosis biliar con insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal. En estos animales, se produce un incremento de las concentraciones espláncicas de citoquinas pro- y anti-inflamatorias. En este trabajo se demuestra la implicación de ambos subtipos de mastocitos, mucosos y conectivos, en hígado, bazo e intestino de los animales colestásicos. En el hígado colestásico, el incremento de células cebadas se podría relacionar con la respuesta inflamatoria fibrogénica, en tanto que, en el íleon podrían estar implicadas en la exacerbada angiogénesis propia de la enteropatía hipertensiva portal. Por último, en el bazo, el incremento de mastocitos es posible que participe tanto en la angiogénesis como en la fibrogénesis, ya que ambos procesos colaboran conjuntamente con la congestión venosa, en la producción de esplenomegalia. Ketotifen, es un antagonista de receptores  $H_1$  de histamina con propiedades estabilizadoras de células cebadas y su administración a los animales colestásicos ha demostrado su posible beneficio en la disminución de las alteraciones causadas por la descompensación de la insuficiencia hepática crónica, que causa a partir de la sexta semana de evolución, ascitis. Se explicaría así la disminución de IL-13 y CGRP en líquido ascítico, así como la disminución espláncica de IL-10. Sin embargo, no modifica el número de células cebadas hepato-intestinales, que persisten aumentadas. Por el contrario, Ketotifen podría ejercer un efecto perjudicial respecto a las alteraciones que son características de la insuficiencia hepática crónica en el territorio espláncico y, en particular, a la angiogenesis, la cual participa en la producción de enteropatía hipertensiva portal, vasculopatía venosa mesentérica y circulación colateral portosistémica. Se explicaría así, que se agraven estas complicaciones en las ratas tratadas con Ketotifen. El hallazgo asociado a estos efectos perjudiciales del incremento de células cebadas de tipo mucoso y de tejido conectivo en los ganglios linfáticos mesentéricos, es un argumento a favor de su implicación patogénica en la exacerbada respuesta angiogénica causada por este estabilizador de células cebadas. Por último, el protagonismo de los mastocitos en la patología espláncica secundaria a

la colestasis extrahepática, permitiría su inclusión entre los síndromes de activación de células cebadas.

# ABSTRACT

**Introduction:** Extrahepatic cholestasis is a condition whose clinical manifestations are icterus, choluria, acholia and pruritus. Biochemically, it is characterised by high levels of serum bilirubin, biliary acids, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase, as well as hypercholesterolemia. In the hepatic parenchyma, cholestasis causes biliary fibrosis/cirrhosis, which leads to chronic liver failure and portal hypertension. For the study of this condition, the experimental model of common bile duct ligation and sectioning in rats is most commonly used. However, this experimental model leads to the development of complications secondary to the formation of a biliary pseudocyst, with cholangitis, liver and lung abscesses, and sepsis. An alternative model proposed in order to reduce these complications is microsurgical resection of the extrahepatic biliary tract in rats, which causes biliary fibrosis, chronic liver failure and portal hypertension with portosystemic collateral circulation.

**Hypothesis and objectives:** Splenic disease secondary to obstructive icterus is considered to be of an inflammatory nature; in particular, mast cells are suspected to play a role in its pathogenesis. For this reason, the experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis in rats has been used in this experimental paper in order to study the involvement of mucosal and connective-tissue mast cells in splenic disease, as well as the response to treatment with the mast-cell-stabilising drug ketotifen.

**Material and methods:** Male Wistar rats were used in this study, their weight ranging between 215 and 335 grams. The animals were distributed randomly in 4 defined groups: 1.-Pseudo-operated rats which underwent only a medium laparotomy (SO) and dissection of the extrahepatic bile duct, 2.-The second group consists of rats that underwent cholestasis surgery (CMQ), resecting the biliary branches, 3.-a third group is formed by rats in which pseudosurgery was performed and afterwards ketotifen was administered (SO+K), from 24h before the intervention to the sacrifice of



the animals at 8-9 weeks postsurgery, and finally a fourth group 4.-which underwent cholestasis surgery and were administered ketotifen following the same time scale mentioned above. (CMQ+K) The following determinations of serum were drawn: bilirubin, bile acids, alkaline phosphatase and total proteins of serum. IL-13 and peptide gene regulator calcitonine (CGRP) was identified in ascitic fluid, macrophages chemotactic protein (MCP-1), TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-13 were determined in splenic tissues. The populations of mucosal mast cells and connective tissue were determined in mesenteric lymph nodes, liver spleen, and ileum.

**Results:** Rats with microsurgical extrahepatic cholestasis at 8-9 weeks of the postoperative course present with icterus, hepatosplenomegaly, ascites, portosystemic collateral circulation, mesenteric venous vasculopathy and hypogonadism. They also suffer an increase in the concentrations of serum bilirubin ( $p < 0.001$ ), biliary acids ( $p < 0.001$ ) and alkaline phosphatase ( $p < 0.001$ ), while total protein concentration decreases ( $p < 0.001$ ). The concentrations of IL-10, IL-13 and macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1), are increased in the hepatic parenchyma and the ileum ( $p < 0.001$ ). The concentrations of tumour necrosis factor (TNF $\alpha$ ), increase in the ileum. Concentrations of IL-13 and the calcitonin gene-related peptide (CGRP) increase in the ascitic fluid. Regarding the overpopulation of mast cells in cholestatic animals, there is a hepatic, intestinal and splenic increase in both mucosal and connective-tissue mast cells ( $p < 0.05$ ). If focusing only over the lymph mesenteric nodes, an increase of connective tissue mast cells is noted ( $p < 0.05$ ).

Loss of body weight was associated with loss of liver, spleen and testicle weight. In cholestatic rats that were treated with ketotifen, there was a decrease in serum bilirubin ( $p < 0.001$ ) and biliary acid concentrations ( $p < 0.001$ ), and an increase in blood protein levels ( $p < 0.05$ ). However, ketotifen reduces spleen TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) concentrations, as well as IL-13 ( $p < 0.01$ ) and CGRP ( $p < 0.001$ ) concentrations in the ascitic fluid. This drug successfully reduces portal pressure in rats with obstructive icterus, but increases the degree of portosystemic collateral circulation. No significant changes were seen in the number of mucosal or connective-tissue mast cells in the liver and the intestine of animals treated with ketotifen versus untreated cholestatic animals. However, cholestatic rats treated with ketotifen suffered a significant increase

in the number of both mucosal and connective-tissue mast cells in the mesenteric lymph nodes ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In the experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis in rats, biliary fibrosis with chronic liver failure and portal hypertension occurs at 8-9 weeks of the postoperative course. These animals experience an increase in splenic pro- and anti-inflammatory cytokines. This paper shows the role of both types of mast cells, mucosal and connective-tissue, in the liver, spleen and intestine of cholestatic animals. The increase in mast cells might be related to the fibrogenic inflammatory response in the cholestatic liver, while mast cells might play a role in the exacerbated angiogenesis that is typical of portal hypertensive enteropathy in the case of the ileum. Lastly, as to the spleen, the increase in mast cells may be involved in both angiogenesis and fibrogenesis, as the two processes act jointly with venous congestion to cause splenomegaly.

Ketotifen is a histamine  $H_1$  receptor antagonist with mast-cell-stabilising properties. The treatment of cholestatic animals with ketotifen has been shown to be possibly beneficial to decrease the alterations due to the decompensation of chronic liver failure, which from the sixth week of the course of the condition causes ascites. This would explain the decrease in IL-13 and CGRP in the ascitic fluid, as well as the splenic decrease in IL-10. However, ketotifen does not alter the number of hepatic and intestinal mast cells, which remain increased.

On the other hand, ketotifen might have a harmful effect in relation to the alterations that are characteristic of chronic liver failure in the splenic area and, in particular, angiogenesis, which plays a role in the development of portal hypertensive enteropathy, mesenteric venous vasculopathy and portosystemic collateral circulation. This would be a possible explanation for the fact that these complications grow more serious in rats treated with ketotifen. Associated with these harmful effects, the finding of an increase in mucosal and connective-tissue mast cells in the mesenteric lymph nodes is an argument for its pathogenic involvement in the exacerbated angiogenic response triggered by this mast cell stabiliser. Lastly, in view of role played by mast

cells in splenic disease secondary to extrahepatic cholestasis, it would be possible to include this disease among mast-cell-activation syndromes.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** The total or partial lack of biliary drainage in the duodenum produces cholestasis. Obstruction of the drainage can be established at any level from the hepatocyte to the duodenum and so depending on their anatomical location, they can be classified as intrahepatic cholestasis or extrahepatic. Cholestasis is a clinical and biochemical syndrome characterized by jaundice, pruritus, acolia, dark urine, and malabsorption as well as increased serum levels of bilirubin, bile acids, alkaline phosphatase, and gamma glutamyl transferase. In the liver parenchyma, cholestasis causes an inflammatory response that produces long-term with hepatic fibrosis and portal hypertension. In turn, the clinically significant complications of portal hypertension, are considered to occur when the hepatic venous pressure gradient is above 10 mmHg. These complications include hepatic encephalopathy, ascites, hepatorenal syndrome and gastroesophageal varices that cause bleeding, as well as increased mortality with each bleeding episode.

To study extrahepatic cholestasis, there have been various experimental models used in the rats. In particular, they can be classified into macroquirúrgicos, ie essentially by bile duct ligation and section, and those that are based on microsurgical resection of the extrahepatic bile duct. The section of the bile duct ligation in the rat, occurs with the establishment of a biliary pseudocyst which can be infected with gram-negative bacteria from the gastrointestinal tract by the mechanism of bacterial translocation. This problem, is associated with the subsequent formation of abscesses in the liver and in the lung which lead the rats to death. However, using microsurgical techniques, you can avoid pseudocyst formation, decrease the incidence of hepatocellular lung abscesses and therefore prevents sepsis and increases the rat survival. One could conclude that the experimental model of microsurgical cholestasis, reduces infectious complications and for this reason, it constitutes an alternative model for studying both extrahepatic cholestasis and portal hypertension.

Extrahepatic cholestasis, causes bladder fibrosis and portal hypertension. In both diseases, the pathophysiological mechanisms involved have an inflammatory nature.

Liver inflammation is an important feature of extrahepatic cholestasis. Among the hepatic inflammatory disorders, we should highlight obstructive cholestasis, edema leukocyte infiltration of portal tracts and proliferation of biliary epithelial cells with portal fibrosis. In particular, the term biliary fibrosis in the liver defines a consistent pattern in the association of biliary ductular proliferation of myofibroblasts that are around the ducts between areas Portal and parenchymal hepatocytes or cause the development of porto-portal fibrous septa. Finally, chronic liver inflammation secondary to extrahepatic process, predisposes to the formation of tumors.

The cholangiocytes are the biliary epithelium and represent a defense system against foreign substances. In response to aggression, cholangiocytes release inflammatory mediators and adhesion molecules that facilitate the recruitment, localization and modulation of the immune response in the biliary tract and liver. In turn, the inflammatory mediators modulate the function and survival of cholangiocytes, promoting both proliferation and differentiation of portal fibroblasts and hepatic stellate cells into myofibroblasts, which would explain the concomitant fibrosing proliferative response in biliary fibrosis / biliary cirrhosis .

Epithelial-mesenchymal interactions play an important influence on the evolution of chronic Cholangiopathies. It's even been suggested, that cholangiocytes as hepatocytes, can be transformed into mesenchymal cells by a process of epithelial-mesenchymal transition in which case this process could also contribute to the generation of myofibroblasts and therefore the production of biliary fibrosis. One could conclude that extrahepatic cholestasis, shares with other types of Cholangiopathies: biliary proliferation, ductopenia by inhibiting proliferation or by apoptosis, biliary fibrosis and carcinogenesis.

Bacterial infections are common in patients with chronic liver failure no matter of its etiology. The most common infections are spontaneous bacterial peritonitis, urinary tract infections and pneumonia which in 80% of cases are caused by gram-negative

and, in particular, *Escherichia coli*, suggesting that these infectious episodes suffered by patients with chronic liver disease, are of enteric origin. The passage of viable bacteria from the intestinal lumen through the wall to the mesenteric lymph nodes and other tissues or organs of the economy, is an accepted pathogenic mechanism that explains the development of bacterial infections in patients with chronic liver failure and therefore, patients with extrahepatic cholestasis.

However, the most representative alteration of chronic liver impairment, including secondary extrahepatic cholestasis, is the existence of both splanchnic and systemic hyperdynamic circulation. Hyperdynamic circulation is attributed to increased circulating vasodilators such as a reduced response to vasoconstrictors.

In turn, hepatic fibrosis that occurs in rodents after bile duct ligation and division, is the result of an inflammatory process biliary studying, therefore, the changes characteristic of inflammation: oxidative and nitrosative stress and impairment antioxidant activity of portal tracts edema, hepatic macrophage activation and recruitment of inflammatory cells, in particular neutrophilic infiltration of the liver ductular spaces and mast cells in the portal tracts and septa portals in the vicinity of the capillary biliar arterial plexus. In this regard, biliary fibrosis is similar to the tissue repair process that occurs in wound healing and is characterized by accumulation of extracellular matrix proteins, particularly collagen .

They are especially abundant in the anatomical sites that are directly exposed to the environment, such as the gastrointestinal tract, skin and airways. It has been shown that mast cells are present in the liver, both in normal and pathological conditions in humans and in rats. Multiple studies have shown that mast cells are involved in various liver diseases, thus demonstrating that these immune cells have a larger role than originally thought.

Mast cells contain histamine, heparin, serine proteases such as tryptase and chymase, and multifunctional cytokines, which are important mediators of wound healing processes. Thus, mast cells play a key role in tissue remodeling and fibrosis. Various

mediators synthesized by these cells, as tryptase, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , can induce proliferation of fibroblasts and hepatic stellate cells, and collagen synthesis by different cell types. Mast cells also produce matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-2 and MMP-9), as well as tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1) which indicates that folks are also involved in the degradation of extracellular matrix, contributing therefore to an imbalance between synthesis and degradation.

Activated mast cells produce large amounts of fibrogenic and chemotactic factors that induce proliferation of fibroblasts and collagen synthesis. Mast cells, thus increase fibrosis, help tissue remodeling and repair and accumulate in inflammatory bowel disease in humans, including ulcerative colitis, irritable bowel syndrome and Crohn's disease as well as in portal hypertensive enteropathy of the rat. Furthermore, mast cells are involved in the development of fibrosis in diseases of articular cartilage, skin, lung, kidney and liver.

In the liver, mast cells accumulate in many diseases such as alcoholic liver disease, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, biliary atresia, hepatolithiasis, chronic graft rejection in liver and biliary cholestasis. As in other organs and tissues, liver mast cells must be involved in the local immune response in the maintenance and repair of connective tissue. In the liver, mast cells secrete several mediators that promote growth and proliferation of fibroblasts and stimulates the production of extracellular matrix proteins by fibroblasts and stellate cells. In fact, there is a positive correlation between the degree of accumulation of mast cells and the extent of matrix deposition in patients with chronic liver disease. Even today it is considered that bile ductular proliferation, coupled with hepatic fibrosis and mast cell infiltration are characteristic changes of cholestatic liver disease.

It has been shown that degranulation of mast cells is involved in the disruption of cellular motor complexes secondary to the action of cholecystokinin, therefore, the mast cells are actively involved in physiological and pathological control of intestinal motility and in the permeability of the intestinal mucosa, in bacterial adherence to the mucosa and in the onset of intestinal inflammation. In cholestatic liver occurs

infiltration by inflammatory cells (monocytes, neutrophils, mast cells), partly as a result of intestinal bacterial translocation.

However, the origin of the inflammatory response may be located at the very cholangiocytes, who suffer from both bladder and the hyper toxic effect of bile acids, as the possible secondary ischaemia of the biliar arterial plexus compression. In this sense, the initial inflammatory response, stimulates proliferation cholangiocytes, activates liver cells possessing inflammatory capability (Kupffer cells and macrophages), induces angiogenesis secondary to arterial ischemia portal favor leukocyte infiltration and finally promotes fibrogenesis.

Mast cells are involved in the development of hepatic fibrosis in both rodents and humans. Since mast cells, usually have wide distribution in the spleen, one might suspect their involvement in splanchnic inflammatory response secondary to extrahepatic cholestasis, as well as their response to treatment with Ketotifen, a drug stabilizing their membrane. To test this hypothesis, it has been used an experimental model of cholestasis extrahepatic microsurgery in rat, and there have been studied both inflammatory mediators that can produce mast cells, such as alterations in splanchnic distribution of mucosal and connective mast cells. It has also been studied their response to treatment with ketotifen.

## **HYPOTHESIS AND OBJECTIVES:**

1. HYPOTHESIS. Splanchnic pathology and hepato-biliary fibrosis secondary to obstructive cholestasis, are considered to have an inflammatory nature, and in particular, it is suspected that mast cells are involved in its pathogenesis. For this reason, at the present experimental work, it has been used the experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis in rats, to study the involvement of the mucosal-type mast cells and connective tissue mast cells in this disease and its response to treatment with the antiH1 mast cell stabilizer, Ketotifen. This drug is an antiinflammatory substance so that it inhibits the release of mediators of inflammation, both stored as synthesized de novo from mast cells , consequently, it decreases splanchnic disturbances secondary to extrahepatic cholestasis.



2. OBJECTIVES: In this work, the main purpose is to demonstrate, in an experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis, the existence of an alteration in the distribution of the splanchnic mucosal and connective mast cells. Confirmatory manner above, when administering Ketotifen, a drug mast cell membrane stabilizer, it modifies splanchnic redistribution of mast cells and reduces alterations associated with inflammatory mediators. Ketotifen treatment, can therefore determine the pathogenetic inflammatory mechanisms

that take place in an experimental obstructive jaundice cholestasis , typical from the mucosal and connective mast cells.

**MATERIAL AND METHODS:** Male Wistar rats were used in this study, their weight ranging between 215 and 335 grams. The animals were distributed randomly in 4 defined groups: 1.-Pseudo-operated rats which underwent only a medium laparotomy (SO) and dissection of the extrahepatic bile duct, 2.-The second group consists of rats that underwent cholestasis surgery (CMQ), resecting the biliary branches, 3.-a third group is formed by rats in which pseudosurgery was performed and afterwards ketotifen was administered (SO+K), from 24h before the intervention to the sacrifice of the animals at 8-9 weeks postsurgery, and finally a fourth group, 4.-which underwent cholestasis surgery and were administered ketotifen following the same time scale mentioned above (CMQ+K). The following determinations of serum were drawn: bilirubin, bile acids, alkaline phosphatase and total proteins of serum (by colorimetric studies). IL-13 and peptide gene regulator calcitonine (CGRP) were identified in ascitic fluid through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Macrophages chemotactic protein (MCP-1), TNF-alpha, IL-10 and IL-13 were determined in splenic tissues also by ELISA method.

Likewise, the populations of mucosal mast cells and connective tissue were determined in mesenteric lymph nodes, liver, spleen, and ileum. These latter data were obtained by ELISA assessment (RMCP-II) and toluidine blue staining in the case of RMCP-I. The degrees of mesenteric venous vasculopathy, splenorenal collateral circulation and body weights, liver, testis and spleen, have also been determined.

The experimental microsurgical technique, involves several steps. First, it comes the rat sedation by an intraperitoneal infusion of a mixture of xylazine and ketamine. Once asleep, one have to proceed to make a xifopubian incision and exposure of liver tissue after removal, from a gauze soaked in serum, the bowel properly preserved loops. Then, triangular and falciform ligaments are sectioned and a dissection is started from the distal intrapancreatic common bile duct up into each lobe of the liver. It should be added at this point, some data from the rat liver anatomy, as it has 4 separate drainage lobes and the vascularization is as well independent. They have a lack of gallbladder, a fact that does not occur in the mouse. It is important to note that, while the common bile duct is being dissected, one must be careful not to cut the hepatic artery and portal vein, that are closely related to the extrahepatic biliary duct, because this may lead to the rat death instantly. Once the bile duct is dissected, it can be bound in its more distal part so that ingurgite, leaving easier the resection of the independent bile ducts that go to each lobe individually. The bile duct resection should be performed flush to the parenchyma, in the order described, firstly the caudate lobe, right side, middle and finally the left side. Once the bile duct is resected, the intestinal bowel loops should be replaced into the abdominal space and the closure of the abdominal wall is performed. Throughout the postoperative period, analgesics are administered, as well as vitamin K and antibiotic (ceftazidime) to prevent pain, bleeding and infection, respectively. From 24 hours before cholestasis and all throughout the postoperative period, ketotifen is administered in drinking water so that the rat that did not drink the minimum amount, it might be excluded from the study. The sacrifice of animals was carried out at the 8-9<sup>th</sup> week of surgery. After obtaining the blood samples from the inferior vena cava, ascites fluid and tissues (liver, spleen, mesenteric lymph nodes and spleen lymph nodes), the results have been analyzed using the SPSS statistic programme .

**RESULTS:** A total of 80 rats have been studied, 65 survivors, which represents a 20% of mortality in relation to anesthesia and surgical technique (8.7%) and 11.3% in relation to gastrointestinal bleeding. As postoperative complications include abdominal wall hernias, trophic skin changes, drowsiness, and decreased level of consciousness as well as decreased response to painful stimuli. All rats had obvious jaundice in

conjunctiva, ear, and tail, acolia and coluria as well. A decrease of all these postoperative complications described was evident in all cases with the administration of ketotifen. In macroscopic histological findings, the liver was enlarged and yellowish congested but with some focus of necrosis, a figure that is reduced when administering ketotifen. Also evidenced ascites with ketotifen was lower in all series. At thoracic level, the existence of pulmonary infarction and pleuro-pericardial effusion was proven.

Body weight, liver, spleen and testis changes have also been analyzed. Body weight increases in postoperative in all series and ketotifen administration decreases this weight increase. Both hepatomegaly and splenomegaly occur in CMQ rats, and with the administration of ketotifen it is evidenced a significant decrease of both parenchyma weights ( $p < 0.001$ ). Testicular weight of animals with cholestasis, is diminished over pseudoperated rats ( $p < 0.001$ ), while in the first, ketotifen increases even more the weight loss ( $p < 0.01$ ). Operated animals develop collateral portosystemic circulation, specially in the splenorenal area, and this is bigger when administering ketotifen (55.55%). Virtually all animals with cholestasis had mesenteric venous vasculopathy, although in those treated with ketotifen, the development of this type of vasculopathy was higher (76.47%), grade 2 in particular. The vasculopathy, was almost characterized by a large aspect dilatation and tortuosity of the mesenteric vessels. Most of operated animals had ascites at the end of the postoperative period of 8-9 weeks, although their drug administration was not statistically significant (80% in rats with CMQ vs. 77.77% in rats with CMQ + K). Regarding the volume of ascites, although the administration of ketotifen seems to reduce when administered to rats with cholestasis, after statistical comparison by Student's t for equality of means, the difference is not statistically significant.

Rats with complete resection of the extrahepatic biliary duct 8-9 weeks after the operation, suffer increased serum bilirubin ( $p < 0.001$ ), bile acids ( $p < 0.001$ ) and alkaline phosphatase ( $p < 0.001$ ), as a decrease of the total protein concentration ( $p < 0.001$ ). In operated rats, there is an increase in the ascites fluid concentrations of IL-13 and CGRP. Concentrations of tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ), IL-10 and IL-13 increase in the hepatic and ileum parenchyma of cholestatic animals and also the

concentrations of MCP-1 ( $p < 0.001$ ) raise indeed. In mesenteric lymph nodes of cholestatic rats, the levels of MCP1 and IL-13 decrease, whereas in this tissue, there are no differences in the concentration of TNF-alpha or IL-10 when compared to pseudoperated rats.

In cholestatic rats that were treated with Ketotifen, there was a decrease in serum bilirubin ( $p < 0.001$ ) and bile acids ( $p < 0.001$ ) as well as alkaline phosphatase ( $p < 0.01$ ) and increased protein levels ( $p < 0.05$ ). Ketotifen reduces splanchnic concentrations of IL-13 ( $p < 0.01$ ) and CGRP ( $p < 0.001$ ) in the ascites fluid. The administration of this drug, decreases the concentrations of MCP-1 ( $p < 0.01$ ), TNF alpha ( $p < 0.05$ ), IL-10 ( $p < 0.05$ ) and IL-13 in liver, as well as those of TNF alpha and IL -13 in ileum ( $p < 0.01$ ).

The two subpopulations of mast cells that have been determined in liver, spleen, mesenteric lymph node, and ileum, are known as mucosal mast cells (rat mast cell protease (RMCP II) and connective tissue mast cells (RMCP I)). In a cholestatic rat liver, there is an increase of both mucosal and connective mast cells although ketotifen administration does not avoid this increase in liver of neither of the mast cell groups. In the spleen, there is an increase in mucosal mast cells as well as connective mast cells in microsurgical cholestasis rats ( $p < 0.05$ ) however, when treated with ketotifen, there is a decrease in the density of connective tissue mast cells, while the density of mucosal mast cells, does not lead to significant changes. Extrahepatic microsurgical cholestasis rats do not suffer an increase in the density of mucosal mast cells (RMCP-II) or connective mast cells (RMCP-I) in the mesenteric lymph nodes in comparison to pseudoperated animals. However, when treated with Ketotifen, there is a decrease in the density of mast cells in animals with pseudoperation while cholestatic animals have no fewer mast cells but on the contrary, they suffer an increase statistically significant respect pseudoperated rats ( $p < 0.05$ ). In extrahepatic cholestasis rats there was an increase in the density of mast cells in the ileum ( $p < 0.05$ ). This increase is significant over pseudoperated animals in the case of mucosal mast cells. When pseudoperated animals are treated with ketotifen, the number of connective and mucosal mast cells in the ileum increases, although this increase is not statistically significant. In turn, the cholestatic rats that were treated with Ketotifen presented no significant variation in

the density of mast cells, nor mucosal nor connective, respect to untreated cholestatic animals. Therefore, one could conclude that extrahepatic cholestasis causes increased density intestinal mast cells, which does not change significantly when administering Ketotifen.

Regarding the mast cell subpopulations in cholestatic animals, an increase in both hepatic and splenic intestinal mast cells both mucous-like and connective tissue mast cells was noted. In the mesenteric lymph nodes an increase in connective tissue mast cells ( $p < 0.05$ ) was observed. No significant changes were observed in the number of mucosal and connective mast cells in the liver and intestine of treated animals, when comparing them to untreated cholestatic animals. However, cholestatic rats that took Ketotifen suffered a significant increase in the number of mucous and connective mast cells in the mesenteric lymph nodes.

**CONCLUSION:** In the experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis in rats, biliary fibrosis with chronic liver failure and portal hypertension occurs at 8-9 weeks of the postoperative course. These animals experience an increase in splenic pro- and anti-inflammatory cytokines. This paper shows the role of both types of mast cells, mucosal and connective-tissue, in the liver, spleen and intestine of cholestatic animals. The increase in mast cells might be related to the fibrogenic inflammatory response in the cholestatic liver, while mast cells might play a role in the exacerbated angiogenesis that is typical of portal hypertensive enteropathy in the case of the ileum. Lastly, as to the spleen, the increase in mast cells may be involved in both angiogenesis and fibrogenesis, as the two processes act jointly with venous congestion to cause splenomegaly.

Ketotifen is a histamine  $H_1$  receptor antagonist with mast-cell-stabilising properties. The treatment of cholestatic animals with ketotifen has been shown to be possibly beneficial to decrease the alterations due to the decompensation of chronic liver failure, which from the sixth week of the course of the condition causes ascites. This would explain the decrease in IL-13 and CGRP in the ascitic fluid, as well as the splenic

decrease in IL-10. However, ketotifen does not alter the number of hepatic and intestinal mast cells, which remain increased.

On the other hand, ketotifen might have a harmful effect in relation to the alterations that are characteristic of chronic liver failure in the splenic area and, in particular, angiogenesis, which plays a role in the development of portal hypertensive enteropathy, mesenteric venous vasculopathy and portosystemic collateral circulation. This would be a possible explanation for the fact that these complications grow more serious in rats treated with ketotifen. Associated with these harmful effects, the finding of an increase in mucosal and connective-tissue mast cells in the mesenteric lymph nodes is an argument for its pathogenic involvement in the exacerbated angiogenic response triggered by this mast cell stabiliser. Lastly, in view of role played by mast cells in splenic disease secondary to extrahepatic cholestasis, it would be possible to include this disease among mast-cell-activation syndromes.

## ***I. INTRODUCCIÓN***

## 1. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA Y RESPUESTA INFLAMATORIA

La colestasis se define como la obstrucción al flujo biliar . El déficit total o parcial de drenaje biliar hacia el duodeno produce colestasis (Attar 1982; Gossard 2013) y se clasifica en extrahepática e intrahepática (Sherlock 1989). La causa de la colestasis intrahepática reside en el hígado en tanto que el término extrahepático implica la obstrucción de la vía biliar fuera del parénquima hepático (Sherlock 1989; Li y Crawford 2004). Los principales síntomas y signos de las colestasis intrahepáticas y extrahepáticas son similares. En particular la ictericia y el prurito son características clínicas de ambos tipos de colestasis, si bien es frecuente que las alteraciones bioquímicas plasmáticas precedan su instauración (Gossard 2013). Para realizar el diagnóstico diferencial entre las colestasis intra- y extra-hepáticas es precisa una cuidadosa evaluación de sus características clínicas, serológicas e histopatológicas (Sherlock 1989; Li y Crawford 2004; Gossard 2013).

Respecto a las colestasis extrahepáticas su causa es la obstrucción mecánica de los grandes conductos biliares, como son en el humano, los conductos biliares derecho e izquierdo, el conducto hepático y el conducto colédoco (Schaffner y Popper 1979; Sherlock 1989). Dicha obstrucción puede ser causada a su vez por malformaciones biliares (Nakamura y Tanoue 2013), litiasis (Li y Crawford 2004; Hirschfield et al, 2010), tumores biliares (Hirschfield et al, 2010) o compresión extrínseca de la vía biliar (Suarez et al, 2013) (Tabla 1). Con independencia de su etiología, la colestasis extrahepática se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner y Popper 1979; Sherlock 1989; Gossard 2013). Las alteraciones bioquímicas se relacionan principalmente con la retención sanguínea de todas las sustancias normalmente excretadas en la bilis (Sherlock 1989). Al incremento sérico de bilirrubina y ácidos biliares se asocian elevadas concentraciones séricas de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil transferasa y colesterol (Li y Crawford 2004).



**TABLA 1: ETIOLOGIA DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA**

- Atresia biliar extrahepática
- Litiasis biliar
- Lesiones inflamatorias.
  - \* Colangitis esclerosante primaria y secundaria
  - \* Estenosis postoperatorias
    - ^ Colédoco
    - ^ Esfínter de Oddi
  - \* Biliopatía hipertensiva portal por obstrucción extrahepática de la vena porta.
  - \* Pancreatitis
    - ^ Aguda
    - ^ Crónica
  - \* Pseudoquistes pancreáticos
- Tumores
  - \* Intrínsecos
    - ^ Benignos – Papilomas
    - ^ Malignos – Colangiocarcinomas
- Extrínsecos
  - ^ Pancreáticos
  - ^ Gástricos
  - ^ Metástasis ganglionares hiliares hepáticas

^ Lifomas: Enfermedad de Hodgkin

- Causas inusuales

- \* Quistes del colédoco
- \* Abscesos amebianos
- \* Divertículos duodenales
- \* Infecciones parasitarias: Ascariasis, fascioliasis
- \* Hemobilia

La inflamación hepática es una característica importante de la colestasis extrahepática. Entre las alteraciones inflamatorias hepáticas de la colestasis obstructiva destaca el edema con infiltración leucocitaria de los tractos portales y la proliferación de las células epiteliales biliares con fibrosis portal (Schaffner y Popper 1979; Saito y Maher 2000; Tacke et al, 2009). En particular, el término fibrosis biliar, define un patrón hepático consistente en la asociación de proliferación ductular biliar y de los miofibroblastos periductulares entre las áreas portal y hepatocitaria o parenquimatosa que causa el desarrollo de septos fibrosos porto-portales (Parola y Pinzani 2009). Por último, la inflamación hepática crónica secundaria a la colestasis extrahepática predispone a la tumorigénesis (Aller et al, 2010; Pinzani et al, 2011).

Los colangiocitos constituyen el epitelio biliar y representan un sistema defensivo contra sustancias extrañas (Chuang et al 2009). En respuesta a la agresión, los colangiocitos liberan mediadores inflamatorios y expresan moléculas de adhesión que facilitan el reclutamiento, localización y modulación de la respuesta inmunitaria en el tracto biliar y el hígado (Syal et al, 2012). A su vez, los mediadores inflamatorios modulan la función y supervivencia de los colangiocitos, favoreciendo tanto su proliferación como la diferenciación de los fibroblastos portales y células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, lo que explicaría la concomitante respuesta proliferativa biliar y fibrosante en la fibrosis/cirrosis biliar (Reynoso-Paz et al, 1999; Syal et al, 2012).

## INTRODUCCIÓN

---

Las interacciones epitelio-mesenquimales desempeñan una importante influencia en la evolución de las colangiopatías crónicas. Incluso se ha sugerido que los colangiocitos como los hepatocitos, pueden transformarse en células mesenquimales mediante un proceso de transición epitelio-mesenquimal en cuyo caso este proceso podría también contribuir a la generación de miofibroblastos y, por tanto, a la producción de fibrosis biliar (Park, 2012).

Se podría concluir que la colestasis extrahepática, comparte con otros tipos de colangiopatías la existencia de proliferación biliar, ductopenia por inhibición de la proliferación o por apoptosis, fibrosis biliar y carcinogénesis (Park, 2012; Syal et al, 2012).

Una complicación frecuente de la colestasis extrahepática es la infección bacteriana con colangitis y posterior formación de abscesos. Charcot describió en 1877 la triada clínica de fiebre, ictericia y dolor en el hipocondrio derecho que se asocia a la colangitis secundaria a litiasis o estenosis del colédoco (Lipsett y Pitt 1990). En 1959 Reynolds y Dargan describen una grave evolución de colangitis que cursa con shock séptico y obnubilación (Reynolds y Dargan, 1959). Aunque se ha utilizado también el término "colangitis supurativa", no todos los pacientes con bilis purulenta presentan shock séptico, ni todos los pacientes con los tipos evolutivos más graves de colangitis presentan pus en los conductos biliares (Lipsett y Pitt 1990).

Otra grave consecuencia de la colestasis extrahepática en particular cuando se cronifica, es la hipertensión portal. Las complicaciones clínicamente significativas de la hipertensión portal, se considera que se producen cuando el gradiente de presión venosa hepática es superior a 10 mmHg (Miñano y García-Tsao 2010). Entre estas complicaciones destacan la encefalopatía hepática, la ascitis, el síndrome hepatorrenal y las varices gastroesofágicas que son causa de hemorragia, así como de una creciente mortalidad con cada episodio hemorrágico ( Rahimi y Rockey 2011).

Las infecciones bacterianas son frecuentes en los pacientes con insuficiencia hepática crónica con independencia de su etiología. Las infecciones más frecuentes son la peritonitis bacteriana espontánea, las infecciones urinarias y la neumonía, que en el 80% de los casos son causadas por bacilos gram-negativos y, en particular, por *Escherichia*

*coli*, lo que sugiere que estos episodios infecciosos que sufren los pacientes con insuficiencia hepática crónica son de origen entérico (Bellot et al, 2013). El paso de bacterias viables desde la luz intestinal, a través de su pared, hasta los ganglios linfáticos mesentéricos y otros tejidos y órganos de la economía, es un mecanismo patogénico aceptado para explicar el desarrollo de las infecciones bacterianas en el paciente con insuficiencia hepática crónica y, por tanto, en los pacientes con colestasis extrahepática. Este fenómeno ha sido originalmente descrito por Berg y Garlington en 1979 (Berg y Garlington, 1979). Los mecanismos que favorecen la traslocación bacteriana intestinal son, al menos, tres: el excesivo crecimiento de las bacterias intestinales, ya sean normales o anormales, el incremento de la permeabilidad intestinal y las alteraciones inmunológicas que se asocian a la insuficiencia hepática crónica, las cuales incluyen el deficitario sistema inmunológico intestinal constituido por el tejido linfoide asociado al intestino que está compuesto por las placas de Peyer, los linfocitos y células dendríticas de la lámina propia, los linfocitos intraepiteliales y los ganglios linfáticos mesentéricos (Bellot et al, 2013). Por último, la insuficiencia hepática crónica se asocia con una significativa disminución de la actividad del sistema retículo endoplásmico hepático, tanto por la existencia de circulación colateral portosistémica, que evita el tránsito del flujo portal por el hígado, como por la reducida capacidad para la fagocitosis de las células de Kupffer (Rimola et al, 1984).

Sin embargo, la alteración más representativa de la afectación hepática crónica, incluyendo la secundaria a colestasis extrahepática, es la existencia de circulación hiperdinámica tanto esplácnica como sistémica. La circulación hiperdinámica se atribuye tanto al incremento de sustancias vasodilatadoras circulantes como a una reducida respuesta a sustancias vasoconstrictoras (Newby y Hayes 2002; Iwakiri y Groszmann 2006). En esencia, las alteraciones hemodinámicas asociadas a la insuficiencia hepática crónica, hipertensión portal y traslocación bacteriana, sugieren la existencia de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen multifactorial (Aller et al, 2007; Thabut et al, 2007; Tandon y García-Tsao 2008; Cazzaniga et al, 2009; Abdel-Khalek et al, 2011). En este caso las complicaciones propias de la colestasis extrahepática,

tanto locales o hepáticas (fibrosis/cirrosis biliar), regionales o esplánicas (hipertensión portal, circulación colateral portosistémica, traslocación bacteriana intestinal, ascitis) y generales o sistémicas (encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal) por su naturaleza inflamatoria, podrían ser integradas para su estudio etiopatogénico y, por tanto, en la investigación de nuevas y más eficaces tratamientos.

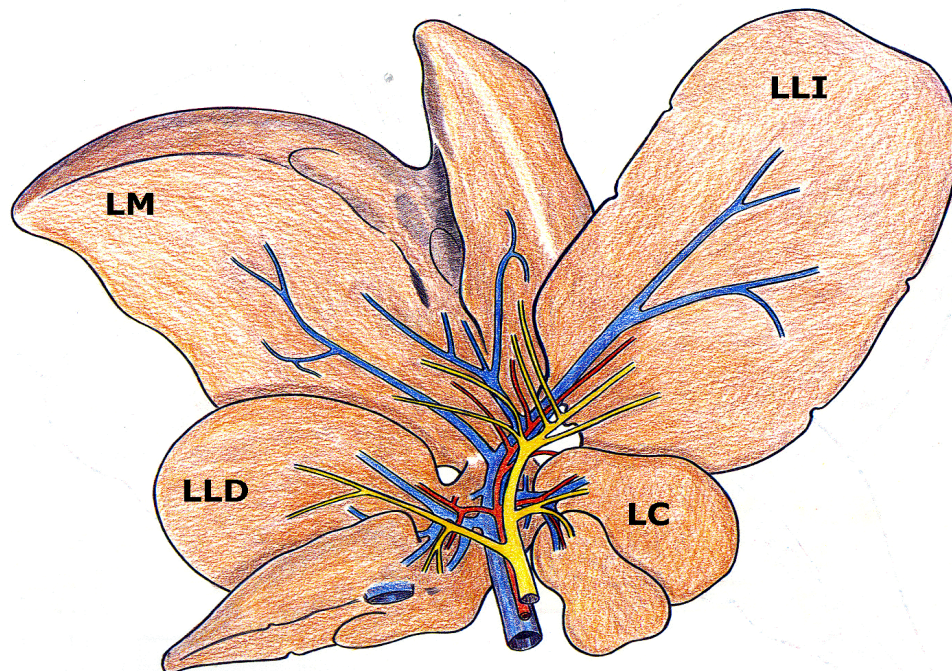
## **2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA**

La colestasis extrahepática cursa con una elevada incidencia de morbilidad y mortalidad (Poupon et al, 2000). Las graves alteraciones hepáticas, esplánicas y sistémicas que produce la ictericia obstructiva, justifica la creación de modelos experimentales que permitan el estudio de sus mecanismos patogénicos con el objetivo de instaurar eficaces medidas profilácticas y terapéuticas (Aller et al, 2008).

El modelo experimental más frecuentemente utilizado de ictericia obstructiva es el resultante de la ligadura y sección del colédoco en la rata, aunque también se ha desarrollado en conejos y ratones (Katsuta et al, 2005; Abraldes et al, 2006). Este modelo se considera que cursa con hipertensión portal sinusoidal (Abraldes et al, 2006). La rata es el animal de elección ya que no posee vesícula biliar, en tanto que en el ratón, la oclusión del colédoco produce una gran dilatación de la vesícula biliar que puede causar su perforación y coleperitoneo (Abraldes et al, 2006), lo que exige ligadura del conducto cístico o bien colecistectomía previa a la colestasis (Aller et al, 2008) (Figura 1). La técnica quirúrgica de ligadura y sección del colédoco es sencilla. Se trata de una técnica macroquirúrgica, ya que no requiere medios de magnificación para su realización. En esencia, y tras laparotomía media o subcostal derecha, se diseña el colédoco y se reseca entre dos ligaduras. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquiste biliar por dilatación del extremo proximal ligado del

## INTRODUCCIÓN

colédoco, que se infecta por microorganismos Gram-negativos y los animales fallecen durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller et al, 1993; Aller et al, 2004; Aller et al, 2009a). En este modelo experimental también se ha descrito el desarrollo de fibrosis biliar por lo que ha sido considerado apropiado para el estudio de la patología humana secundaria a la atresia biliar extrahepática y la colangitis esclerosante primaria (Hayashi y Sakai 2011; Petersen 2012).



**FIGURA 1.** Representación esquemática del hígado multilobulado de la rata. LLD: Lóbulo lateral derecho; LM: Lóbulo Medio; LLI: Lóbulo Lateral Izquierdo; LC: Lóbulo Caudado.

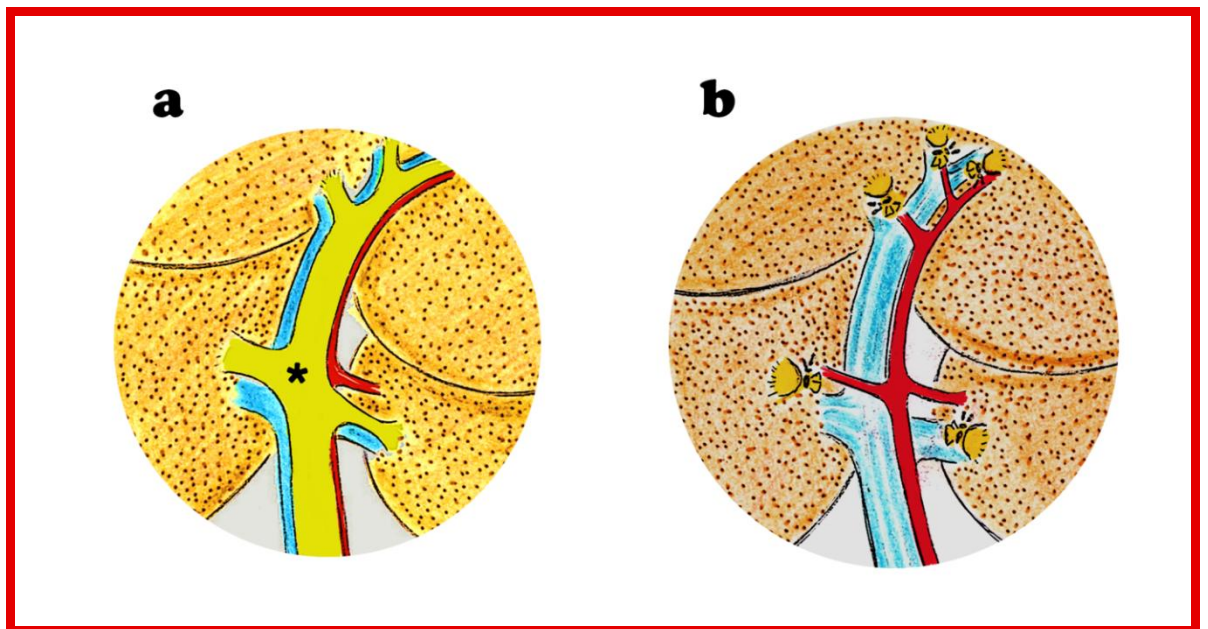
En el ratón, la transección del conducto colédoco entre ligaduras, asociado a colecistectomía, también permite conseguir un modelo para el estudio de la fibrosis biliar, aunque coexiste una extensa necrosis hepática



## INTRODUCCIÓN

(Heinrich et al, 2011). Para evitar la grave lesión hepática se ha propuesto la realización de una ligadura parcial del colédoco. Esta técnica consiste en la ligadura conjunta del colédoco y una aguja quirúrgica de 7-0. Posteriormente, se retira la aguja y así persiste una estenosis graduada del colédoco que produce a los 14 días de evolución, proliferación biliar pero evita la necrosis del parénquima hepático (Heinrich et al, 2011).

La técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata permite la resección de la vía biliar extrahepática que incluye el colédoco, hasta el inicio de su porción intrapancreática, en continuidad con los conductos biliares que drenan cada uno de los lóbulos hepáticos (Aller et al, 1993; Lorente et al, 1995; Aller et al, 2009a; Aller et al, 2009b; Aller et al, 2010) (Figura 2). Con ésta técnica microquirúrgica la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, así como de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller et al, 1993; Aller et al, 2004; Aller et al, 2009a; Aller et al, 2009b; Aller et al, 2010).



**FIGURA 2.** Técnica de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. En el dibujo de la izquierda se representa la vía biliar extrahepática del hígado de la rata (a). En el dibujo de la derecha (b), tras la resección microquirúrgica de la vía biliar

## INTRODUCCIÓN

---

*extrahepática, se observan los conductos lobulares hepáticos ligados a ras del parénquima hepático.*

Este modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, también permite obtener a más largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. A este respecto, se debe considerar que durante la evolución de la colestasis extrahepática en la rata existen dos fases. La fase evolutiva precoz que se extiende hasta la 4ª semana del periodo postoperatorio, y la fase evolutiva tardía que comprende las posteriores semanas de supervivencia (Assimakopoulos y Vagianos 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda, la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático y no existe aún hipertensión portal ni cirrosis, si bien se producen efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos cardíacos (Joubert 1978; Liu et al, 2000; Nahavandi et al, 2001; Hajrasouliha et al, 2004), altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Bomzon et al, 1985; Jacob et al, 1993) y causa una intensa diuresis y natriuresis que pueden incluso producir grave hipovolemia (Green y Better 1995; Kramer 1997). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal que es agravada por la endotoxemia que acompaña a éste modelo experimental. A su vez, durante la fase evolutiva considerada crónica, esto es, superior a las cuatro semanas del postoperatorio, no solo existe colemia, endotoxemia y traslocación bacteriana intestinal (Deitch et al, 1990; Clements et al, 1996; Clement et al, 1998) sino también una significativa patología hepática con fibrosis/cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Green y Better 1985; Geerts et al, 2008) que se asocia con una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Tanto las alteraciones en la fase precoz como en la fase tardía o a largo plazo, de este modelo experimental, validan su empleo para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la colestasis extrahepática así como para la investigación de nuevos y más eficaces tratamientos (Assimakopoulos y Vagianos 2009).

Para la puesta a punto de la técnica microquirúrgica de la colestasis extrahepática en la rata, se ha estudiado previamente la anatomía de la vía



biliar extrahepática, descrito sus variaciones anatómicas (Lorente et al, 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller et al, 1993) así como se ha estandarizado una microtécnica de fácil aprendizaje y mínima mortalidad atribuible a su ejecución. El estudio del modelo experimental se ha fundamentado en la valoración de la patología hepatobiliar, con el grado de fibrosis y proliferación biliar de los hígados colestasis (Aller et al, 2004) y de las alteraciones bioquímicas plasmáticas propias de la lesión hepatobiliar (Aller et al, 2008), así como de las alteraciones del metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López et al, 1999) y cerebral (García-Moreno et al, 2002) y, por último, la respuesta inflamatoria esplácnica mediante la determinación de las concentraciones de citoquinas pro y anti-inflamatorias en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon (García-Domínguez et al, 2010). La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftazidima 50 mg/kg) y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) reduce la mortalidad precoz de las ratas con colestasis extrahepática (Beck y Lee 1995; Huang et al, 2003; Akimoto et al, 2005; Abrales et al, 2006). En particular, en las ratas con colestasis obstructiva microquirúrgica la supervivencia es superior a las ocho semanas y, por tanto, los resultados pueden ser más fácilmente extrapolados a la clínica humana, que se suele caracterizar por la evolución crónica de la colestasis extrahepática.

Los modelos de colestasis extrahepática, tanto macroquirúrgicos, por ligadura del colédoco, como microquirúrgicos por resección de la vía biliar extrahepática, cursan a largo plazo (4ª a 6ª semana del postoperatorio) con hepatomegalia, fibrosis biliar, infiltración leucocitaria de los espacios portales hepáticos y muerte de los hepatocitos por necrosis y apoptosis, aunque rara vez se observa la pérdida de la estructura normal hepática y, por esta razón, no es apropiado conceptuar estos modelos experimentales como productores de cirrosis en esta fase evolutiva (Kountouras et al, 1984; Aller et al, 1993; Aller et al, 2004).

Las alteraciones extrahepáticas son múltiples en la colestasis extrahepática experimental en la rata, con independencia de la técnica quirúrgica empleada. Destacan la ictericia, la coluria (Huang et al, 2003; Aller et al, 2004), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller et al, 1993; Huang et al, 2003; Aller et al, 2004; Chan et

al, 2004; Katsuta et al, 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos 2009), la encefalopatía hepática (García-Moreno et al, 2002; Huang et al, 2010; Magen et al, 2010; Assimakopoulos et al, 2009; Eslimi et al, 2011) y al final de este periodo considerado crónico, 6ª semana del postoperatorio, la ascitis (Huang et al, 2003; Aller et al, 2010a; Aller et al, 2010b). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no solo es un modelo apropiado para el estudio de la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino que también reproduce las alteraciones espláncnicas y sistémicas que son propias de la ictericia obstructiva crónica en la clínica humana.

Un modelo experimental quirúrgico de ictericia obstructiva parcial, ha sido descrito por Polimeno et al En 1995 (Polimeno et al, 1995). La técnica quirúrgica consiste en la sección entre ligaduras de los conductos biliares propios de los lóbulos hepáticos medio, lateral derecho y caudado. Ya que no existe conexión entre los lóbulos hepáticos sometidos a colestasis y el lóbulo lateral izquierdo que no sufre obstrucción biliar, se puede considerar este modelo experimental para el estudio de la evolución crónica de la colestasis extrahepática en los lóbulos lateral derecho, medio y caudado. La colestasis selectiva lobular permite la supervivencia a largo plazo de los animales, aunque no evita que los lóbulos hepáticos colestásicos sufran proliferación biliar, discreta proliferación hepatocitaria e infiltración por células inflamatorias. Sin embargo, un hallazgo inesperado en éste modelo de colestasis selectiva ha sido la existencia de proliferación biliar en el lóbulo lateral izquierdo que no sufría colestasis obstructiva. Este inopinado resultado sugiere a sus autores la existencia de estimulación humoral transmitida por los lóbulos colestásicos a través de mediadores inflamatorios liberados (Polimeno et al, 1995).

La colestasis experimental, en particular de localización extrahepática, se ha considerado un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos implicados en la producción de atresia biliar en la clínica humana (Aller et al, 2008). Sin embargo, otros modelos experimentales no quirúrgicos, se han propuesto como alternativas válidas. Entre estos últimos modelos destacan los modelos de atresia biliar de etiología vírica en ratones, mediante la inoculación intraperitoneal de varios serotipos de reovirus que inducen inflamación del hígado y de los conductos biliares con ictericia (Phillips et al, 1969; Bangaru et al, 1980). Asimismo, se han descrito modelos de colestasis en ratones tras

inoculación de rotavirus de monos Rhesus, que causan acumulo de células asesinas naturales (NK cells) alrededor de los conductos biliares y respuesta mediada por células T, con colestasis evidente a la semana de la inoculación (Leonhardt et al, 2010). Estos modelos de colestasis víricas tienen resultados variables dependientes del tipo de cepa animal, la dosis viral y el tiempo de infección. Un hallazgo de interés en el estudio de los mecanismos productores de colestasis víricas, ha sido la producción de ictericia a receptores inmunodeficientes por transferencia de células T procedentes de ratones con colestasis inducida por rotavirus (Lu y Mack 2009; Lu et al, 2010).

Todos los modelos experimentales de colestasis previamente citados son realizados durante el periodo postnatal y, por esta razón, se considera que aunque permiten estudiar las consecuencias metabólicas de la colestasis y la patogenia de la colangitis, no aportan conocimiento al mecanismo productor de la atresia biliar. Por esta razón, se han desarrollado modelos prenatales, ya ligando el conducto colédoco en corderos a los 80 días de gestación (Spitz 1980) o por ligadura de la arteria hepática en conejos fetales, que produce isquemia selectiva de la vía biliar intrahepática (Morgan et al, 1966). También se ha ensayado la administración de drogas, por ejemplo derivados de setas amanita phalloides, y fármacos, así antihelmínticos así 1,4-fenilendiisotiacianato, a ratas Wistar gestantes que producen ictericia en las ratas recién nacidas (Ogawa et al, 1983; Hosoda et al, 1997). En estos modelos postnatales se consigue la producción de ictericia con inflamación de las vías biliares intrahepáticas aunque las alteraciones propias de la atresia biliar, como son la obstrucción biliar completa, tan solo se obtienen tras la administración a los animales gestantes de tóxicos o fármacos (Ogawa et al, 1983; Hosoda et al, 1997). Sin embargo, los animales y en particular los ratones, no cursan con fibrosis hepática ni con hipertensión portal, por lo que no es posible considerar a la atresia biliar en humanos. Se podría concluir que respecto de esta patología congénita, los modelos experimentales son apropiados para el estudio de las consecuencias hepáticas y extrahepáticas de la colestasis, aunque no para el estudio de los mecanismos productores de atresia biliar (Petersen 2012).

### **3. ALTERACIONES FISIOPATOLOGICAS EN LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA EXPERIMENTAL.**

La fisiopatología hepática en la colestasis extrahepática ha sido comparada a la que protagoniza la curación de las heridas, ya que estaría constituida por la asociación de proliferación epitelial y fibrogénesis (Bissell, 2004; Aller et al, 2008; Meran y Steadman; 2011). Las alteraciones fisiopatológicas que se producen en la fibrosis hepática tienen por consecuencia el depósito excesivo de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular que distorsionan la arquitectura hepática e inducen capilarización sinusoidal e hipertensión portal. En esencia, la fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular aberrante en el que los fenómenos claves son la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes en células similares a miofibroblastos, por un proceso de transición epitelio-mesenquimal de tipo 2, con el subsiguiente incremento en la síntesis de proteínas, como actina de músculo liso- $\alpha$ , de colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Zitka et al 2010; Mormone et al, 2011; Meran y Steadman, 2011; Fragiadaki y Mason, 2011)

En el periodo inmediato a la obstrucción completa de la vía biliar extrahepática en la rata se produce un intenso incremento de la presión biliar intraductal (Slott et al 1990; Woolf et al 1993; Azmaiparashvili et al 2009) seguida por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere et al 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm et al 2000; Matsumoto et al, 2002; Costa et al 2003; Kirkland et al 2010). Estos estudios demuestran la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell et al 2004; Wang et al 2008). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo

## INTRODUCCIÓN

---

de la duración de la obstrucción (Campbell et al 2004). En tanto que algunos genes son activados en el periodo precoz de la colestasis, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima et al 2004).

Después de la ligadura del colédoco, el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (Huang et al 2010; Yang et al 2011; Oguz et al, 2012). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara et al 1993; Li y Yang, 2005; Van Steenkiste et al 2010) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima Oxido Nítrico Síntasa-inducible (iNOS) y de oxido nítrico (NO) (Barón et al 2000; Lee et al, 2011).

La vía biliar es vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio et al 1996; Li et al 2007; Toki et al 2011), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio et al 1996). Estas características del plexo peribiliar, permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática, podría comprimir el plexo peribiliar con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o "*hepatic arterial buffer response*" (Lautt, 1983). Además, dos semanas después de ligadura del colédoco en la rata se produce una proliferación significativa del plexo peribiliar, que drena por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio et al 2006). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka et al 2006; Toki et al, 2011). Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Gartung et al, 1996; Poli, 2000). Además, se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés

oxidativo (Poli, 2000; Huang et al 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) puede inhibir la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutathion peroxidasa, glutathion reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana et al 1997; Mani et al 2002; Wang et al 2007; Portincasa et al 2007; Assimakopoulos, 2007; Arduini et al 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana et al 1997; Assimakopoulos et al 2004; Wang et al 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos et al 2004; Soyly et al 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soyly et al 2006; Assimakopoulos et al 2007; Portincasa et al 2007; Tahan et al 2007).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas, así como a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores etiológicos esenciales de la inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de  $H_2O$  e iones (Portincasa et al 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa et al 2007), puede relacionarse con el aumento de la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies, 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de Glicosaminoglicanos (GAGs) sería un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular de hialuronan (Day y de la Motte, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006; Stern et al 2006; Kennett y Davies, 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett et al 2007; Jiang et al 2007). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, muy extendidas y que

## INTRODUCCIÓN

---

ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Alberts et al 1983; Rhodes y Simons, 2007; Jiang et al 2007). En situaciones de inflamación hialuronan es más polidisperso y tiende a formas de menor peso molecular, favoreciendo así la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang et al 2007), el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático (Chen y Fu, 2005).

Además, la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede alterar por mecanotransducción la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Evanko et al 2007). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado. La rigidez de la matriz extracelular y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos, es fundamental para determinar el fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz, 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por  $\text{CCl}_4$  en la rata se ha descrito la inducción precoz de rigidez hepática. Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado del aumento de la cantidad de matriz neoformada, de la reticulación de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas (Georges et al 2007). Asimismo, el aumento precoz en la rigidez hepática podría ser la causa de la diferenciación de los miofibroblastos en las patologías hepáticas (Georges et al 2007; Muddu et al 2007). La expresión de la función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Lee y Friedman, 2011). Además, la contracción de las células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winau et al 2008).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y

miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Azouz et al 2004; Morwood y Nicholson, 2006; Szabó et al 2007; Muddu et al 2007; Winaw et al 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller et al, 2008). En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson, 2006; Adair-Kirk y Senior, 2008; Yung y Chan 2007). Las Metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca et al 2006; Malemud , 2006; Zitka et al, 2010; Löffek et al, 2011) y, en particular, en el hígado colestásico (Roeb et al 1997; Harty et al 2005; Bergheim et al 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern et al 2006; Yung y Chan, 2007).

Los fragmentos de la matriz extracelular están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006). Así, las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan ejercen una función proinflamatoria uniéndose a los receptores *Toll-like* (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo et al 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  y la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Miyoshi et al 2001; Morwood y Nicholson 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Zhu et al, 2010; Yagi et al, 2011). El tipo 1 (Th<sub>1</sub>) sintetiza Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th<sub>2</sub>) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th<sub>2</sub> están implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz et al 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización,



podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperusión (Kolios et al 2006; Abu-Amara et al, 2010). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter et al 2005; Abrahám et al, 2008; Zandieh et al, 2011; Cheng et al, 2011).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter et al 2005; Abrahám et al, 2008; Zandieh et al, 2011; Cheng et al, 2011) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (*lypopolysaccharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil et al 1997; Minter et al 2005; Kolios et al 2006; Isayama et al 2006; Minter et al, 2009; Kassel et al, 2012). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Harry et al 1999; Isayama et al 2006; Abrahám et al, 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam et al 2002; Iida et al, 2010). Sin embargo, la deplección de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring et al 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de coledoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhibe las vías proinflamatorias hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut et al 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller et al 2006). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura et al 2005; Sigal et al, 2010). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por neutrófilos (Saito et al 2000; Gujral et al 2003; Patsenker et al, 2008; Aller et al 2010; Mantovani et al 2011)

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar et al 2004; Laschke et al, 2010). En la colestasis extrahepática experimental la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy et al 1993; Gujral et al 2003; Georgiev et al 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher, 2000; Dold et al, 2010). Además, las células de Kupffer activadas por la endotoxemia portal secundaria a colestasis, estimulan la liberación de quimioquinas por los hepatocitos, lo cual implica a su vez la infiltración por neutrófilos (Wakabayashi et al, 2008)

En esencia, la inflamación crónica hepática y la fibrogénesis constituyen un agregado dinámico de linfocitos, macrófagos y células del estroma relacionadas por interacciones autocrinas y paracrinas (Holt et al, 2008). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez et al 2006). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner et al 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1, RANTES), factor de activación plaquetario (*platelet activation factor*, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Alberts et al 1983; Bataller y Brenner 2005; Rockey 2006; Iredale 2007; Gressner et al 2007; Friedman 2008; Kassel et al 2012). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Day et al 2005; Rockey 2006; Gressner et al 2007; Aller et al 2010a; Caughey et al 2011). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos

dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Cassiman et al 2002b; Rockey 2006 ;Aller et al 2010a.)

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos) también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan et al 2007). La traslocación bacteriana intestinal es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (Garcia-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf et al 2005; Karatepe et al, 2010; Huang et al, 2012). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana, que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest, 2004). Por lo tanto, la traslocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf et al 2005; Abdeldayem et al 2007; Minter et al 2009). El aumento de la producción de TNF- $\alpha$  puede inducir traslocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- $\alpha$  es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Sztrymf et al, 2004; Francés et al 2007; Aller et al 2010b; Corradi et al, 2012)

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes (Kurz et al 2003; Davis et al, 2011; Geudens y Gerhardt, 2011). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), el endotelio posee otras funciones antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller et al 2007a, Aller et al 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función anti-inflamatoria. Dichas propiedades, anti-oxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller et al 2007b; Rhodes et al 2007). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al

espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller et al 2007b).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, después de 2 a 4 semanas de evolución se desarrolla una significativa proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio et al 1996; Glaser et al, 2009; Glaser et al, 2011).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un aumento de la apoptosis de colangiocitos, se altera la proliferación de los colangiolos con disminución de la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) por los colangiolos y desaparece el plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son preservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio et al 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel et al 2006).

#### **4. LAS CELULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACION Y FIBROSIS**

Las células cebadas por su gran capacidad para sintetizar y almacenar mediadores inflamatorios pueden protagonizar la respuesta inflamatoria esplácnica que se produce en la ictericia obstructiva experimental (Aller et al 2010). En la producción de la fibrosis biliar secundaria a colestasis

extrahepática por ligadura y sección del colédoco han sido implicados mediadores de los sistemas nervioso: Norepinefrina; inmune: citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y endocrino: el sistema renina-angiotensina. A su vez, la fibrosis hepática que se produce en roedores tras la ligadura y sección del colédoco es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kershenobich y Weissbrod 2003; Li y Crawford 2004; Allen et al, 2011) cursando, por lo tanto, con las alteraciones propias de la inflamación: estrés oxidativo y nitrosativo y deterioro de la actividad antioxidante, edema de los tractos portales, activación de los macrófagos hepáticos y reclutamiento de células inflamatorias, en particular infiltración neutrofílica de los espacios periductulares hepáticos y de células cebadas en los espacios porta y en los septos portales en la vecindad de los capilares del plexo arterial peribiliar (Rioux et al. 1996; Takechita y Shibayama 2005). En este sentido, la fibrosis biliar es similar al proceso de reparación tisular que ocurre en la curación de las heridas y que se caracteriza por acúmulo de proteínas de la matriz extracelular, en particular de colágeno (Ng et al 2006; Aller et al 2008a)

Aunque todas las células hepáticas tienen un potencial fibrogénico, son las células estrelladas hepáticas las principales productoras de colágeno en el hígado. Sin embargo, en tanto que las células estrelladas hepáticas activadas son el principal tipo celular fibrogénico en las áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando la lesión hepática tiene lugar alrededor de los tractos portales, como es el caso de la colestasis extrahepática, en la cual se produce una intensa respuesta fibrótica en los tractos portales (Lazaridis et al. 2004; Mormone et al, 2011; Lee y Friedman 2011). De hecho, se ha demostrado que los fibroblastos portales son capaces de transdiferenciarse en miofibroblastos en modelos experimentales de fibrosis en roedores, tras ligadura del colédoco, y en la cirrosis biliar humana (Kinnman y Housset, 2002; Kruglov et al. 2006; Omenetti et al, 2008, Omenetti et al, 2011).

Las células cebadas o mastocitos están ampliamente distribuidas por prácticamente todos los tejidos vascularizados del organismo, donde se localizan en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y los nervios (Galli et al 2005). Son especialmente abundantes en los lugares anatómicos que están directamente expuestos al medio ambiente, como son el tracto gastrointestinal,

la piel y las vías aéreas (Galli et al 2005; Metz et al 2007). Se ha demostrado que las células cebadas están presentes en el hígado, tanto en condiciones normales como patológicas en el ser humano y en la rata (Farrel et al 1995; Rioux et al 1996). Múltiples estudios han comprobado que los mastocitos están implicados en diversas hepatopatías (Farrel et al 1995; Armbrust et al 1997; Yamashiro et al 1998; Matsunaga y Terada, 2000), demostrándose así que éstas células inmunes tienen un papel más amplio de lo que se pensaba originalmente (Franceschini et al 2006).

Las células cebadas contienen histamina, heparina, serinproteasas, como quimasa y tripsina, y citoquinas multifuncionales (Theoharides et al, 2012), que son importantes mediadoras de los procesos de cicatrización y curación de las heridas (Artuc et al. 1999). Por lo tanto, las células cebadas desempeñan un papel clave en la remodelación tisular y la fibrosis. Diversos mediadores sintetizados por estas células, como tripsina, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ , pueden inducir la proliferación de fibroblastos y de células estrelladas hepáticas y la síntesis de colágeno por distintos tipos celulares (Gordon y Galli 1994; Vliagoftis y Befus 2005). Las células cebadas producen además metaloproteasas de la matriz (MMP-1, MMP-2 y MMP-9), así como inhibidores tisulares de MMPs (TIMP-1) (Atamas y White 2003), lo cual indica que están también implicadas en la degradación de la matriz extracelular, contribuyendo por tanto a un desequilibrio entre su síntesis y su degradación (Armbrust et al. 1997).

Las células cebadas activadas producen gran cantidad de factores fibrogénicos y quimiotácticos que inducen la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno (Welle 1997; Valent et al. 1998). Las células cebadas, por tanto, contribuyen a la fibrosis, remodelación y reparación tisular y se acumulan en la enfermedad inflamatoria intestinal en el ser humano, incluyendo la colitis ulcerosa, el síndrome de intestino irritable y la enfermedad de Crohn (He et al 2004), así como en la enteropatía hipertensiva portal en la rata (Díez-Arias et al. 2001; Prieto et al. 2005). Además, las células cebadas están implicadas en el desarrollo de fibrosis en patologías del cartílago articular, la piel, el pulmón, el riñón y el hígado (Armbrust et al. 1997; Kondo et al. 2001; Valent 2013).

En el hígado se acumulan células cebadas en múltiples enfermedades (Fallere et al. 1995), como son la hepatopatía alcohólica, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la atresia biliar, la hepatolitiasis, el rechazo

crónico del injerto hepático y en la colestasis biliar. Al igual que en otros órganos y tejidos, en el hígado las células cebadas deben estar implicadas en la respuesta inmune local y en el mantenimiento y la reparación del tejido conectivo.

En el hígado, las células cebadas secretan varios mediadores que promueven el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos y que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos y las células estrelladas (Valent et al 1998; Takeshita y Shibayama 2005). De hecho, existe una correlación positiva entre el grado de acumulación de células cebadas y la extensión del depósito de matriz en pacientes con hepatopatías crónicas (Fallerel et al. 1995). Incluso en la actualidad se considera que la proliferación ductular biliar, unido a la fibrosis y a la infiltración hepática por células cebadas son los cambios característicos de la hepatopatía colestásica (Takeshita y Shibayama 2005).

Se ha comprobado que la degranulación de las células cebadas está implicada en la disrupción de los complejos motores celulares secundaria a la acción de la colecistoquinina, por lo tanto, las células cebadas están activamente implicadas en el control fisiológico y patológico de la motilidad intestinal (Saavedra et al, 2003), así como en la permeabilidad de la mucosa intestinal, en la adherencia bacteriana a la mucosa y en el inicio de la inflamación intestinal.

En el hígado colestásico se produce la infiltración por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos, células cebadas), en parte como consecuencia de traslocación bacteriana intestinal. Sin embargo, el origen de la respuesta inflamatoria podría estar localizada en los propios colangiocitos, que sufren tanto la hiperpresión biliar y el efecto tóxico de los ácidos biliares, como la posible isquemia secundaria a la compresión del plexo arterial peribiliar (Nakamura et al 1997; Gurish et al 2006; Gaudio et al 2006; Allen et al, 2011). En éste sentido, la respuesta inflamatoria inicial en los colangiocitos estimularía su proliferación, activaría las células hepáticas que poseen capacidad proinflamatoria (células de Kupffer y macrófagos), induciría la angiogénesis secundaria a la isquemia arterial, favorecería la infiltración portal por leucocitos y, finalmente promovería la fibrogénesis.

Las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis hepática, tanto en roedores como en el ser humano (Armbrust et al 1997; Matsunaga et al 1999). La ligadura del colédoco en la rata, un modelo de fibrosis hepática (Kountouras et al 1984), cursa con un aumento de las células cebadas en el hígado (Mori et al 1966; Rioux et al 1996; Hallgreen et al 2007). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis. Ya que la ligadura del colédoco en la rata produce una inflamación hepática (Ramadori y Saile, 2004a) y muchos mediadores liberados por las células cebadas son pro-inflamatorios (Galli et al 2005; Metz et al 2007; Theoharides et al, 2012), se podría especular que la activación de las células cebadas influiría en la fibrosis hepática en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica. En este sentido, la fibrosis asociada a la remodelación tisular, ambas mediadas por los mastocitos, podrían ser una de las principales consecuencias de la inflamación hepática crónica (Bachelet et al 2006; Metz et al 2007). Por ello, se ha sugerido que la fibrogénesis hepática se asemeja a un proceso de cicatrización (Ramadori y Saile, 2004a; Ramadori y Saile, 2004b; Aller et al, 2008a)

Las interacciones entre las células cebadas y los fibroblastos son fundamentales en la génesis de la fibrosis (Gruber, 2003; Albrecht et al 2005). Las células cebadas pueden comunicarse con los fibroblastos, lo cual induce su activación y la subsiguiente modulación de algunos aspectos de la fibrosis (Albrecht et al 2005; Au et al 2007). Sin embargo, los resultados de un estudio que utilizaba ratas *Ws/Ws*, deficientes en células cebadas, sugirió que un aumento de células cebadas en el hígado podría estar asociado con fibrosis, pero que no era la causa (Sugihara et al 1999). Además, las células cebadas deben participar en la fibrinólisis produciendo MMP-1 en los estadios tardíos, tanto de la fibrosis como de la cirrosis experimental (Jeong et al 2002). Ya que las terapias efectivas de la cirrosis hepática deben estar basadas en la comprensión de su patogenia (Friedman, 2008), un mejor conocimiento de ésta acción dual, pro- y anti-fibrogénica de las células cebadas en la fibrosis biliar experimental sería de gran interés.

Las células cebadas en el hígado fibrótico pueden además estar implicadas en la arterialización hepática ya que la estructura de los sinusoides cambia y es similar a la de los capilares (Zimmermann et al 1999). Este cambio se denomina



“capilarización sinusoidal” y las células cebadas pueden ser elementos clave en éste proceso de transformación de las células endoteliales sinusoidales en células endoteliales de tipo capilar (Zimmermann et al 1999; Franceschini et al 2006). La capilarización altera el intercambio fisiológico entre el plasma y los hepatocitos y es la causa principal del empeoramiento de la función hepática (Zimmermann et al 1999).

La hiperplasia de las células cebadas se asocia con la proliferación biliar durante la colestasis extrahepática (Takeshita y Shibayama, 2005; Franceschini et al 2006). Este hallazgo sugiere que la acumulación de células cebadas en las tríadas portales puede estar implicada en la proliferación biliar. La recanalización del colédoco previamente ligado comporta un incremento brusco y transitorio del número de células cebadas, que se asocia con un rápido aumento del número de células epiteliales biliares apoptóticas. Así, las células cebadas intersticiales hepáticas pueden estar implicadas en la remodelación hepática mediante la inducción de apoptosis (Takeshita y Shibayama, 2005).

Por lo tanto, se podría especular que el papel de las células cebadas en la colestasis extrahepática experimental es doble, es decir, que cambia a lo largo de la evolución del hígado colestásico. En fases evolutivas precoces las células cebadas participarían en el proceso proinflamatorio que induce la proliferación biliar y la fibrogénesis (Rioux et al 1996; Metz et al 2007). Sin embargo, la colestasis prolongada al modificar el medio ambiente induciría un cambio en el fenotipo de los mastocitos, promoviendo la fibrolisis al inducir metaloproteasas y, subsiguientemente la degradación de la matriz (Jeong et al 2002). Este supuesto papel protector y antifibrótico de las células cebadas en la colestasis crónica explicaría el incremento persistente de su número durante la producción de fibrosis y/o cirrosis hepática, que se asocia con un marcado descenso de miofibroblastos y de macrófagos en las regiones periportales (Jeong et al 2002). Las células cebadas, debido a su localización periportal, inducirían la apoptosis del epitelio biliar reduciendo la apoptosis hepatocitaria y éste puede ser otro mecanismo por el cual las células cebadas inducen una actividad antifibrogénica, así como la preservación de los hepatocitos (Canbay et al 2004; Ghavami et al 2005).

Al corregir el imbalance epitelial producido por la colestasis entre los dos tipos de células epiteliales hepáticas, biliar (proliferación) y hepatocitario (apoptosis), los mastocitos intentarían limitar la fibrosis característica de la inflamación

hepática crónica. Estas acciones protectoras pueden ser asumidas en algunas circunstancias por las células cebadas que protagonizarían entonces el control de la inflamación (Kinet 2007; Metz y Maurer 2007). La hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias por los colangiocitos colestásicos también podría regular tanto las alteraciones en la secreción biliar (Geier et al 2003) como la supervivencia de los propios colangiocitos (Woolf y Vierling 1993).

La ligadura del colédoco en la rata causa la proliferación biliar con elongación del árbol biliar, así como su ramificación (Nakanuma et al 1997; Masyuk et al 2001). A su vez, la proliferación biliar induce la proliferación vascular o angiogénesis. La vía biliar se rodea de un plexo vascular arterial que procede de las ramas de la arteria hepática (Nakamura et al 1997). Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales biliares migran a través del mesénquima y se transforman en túbulos durante el estadio de formación de la vía biliar intrahepática (Roberts et al 1997). A su vez, el plexo vascular arterial peribiliar se desarrolla y madura en relación con el tracto biliar. Sin embargo, en tanto la vía biliar madura, el plexo vascular periarterial permanece inmaduro y continúa proliferando hasta que alcanza su madurez a lo largo de la vida postnatal (Nakamura et al 1997). En la colestasis extrahepática la proliferación biliar también parece preceder a la proliferación vascular (Gaudio et al, 2006). Tras la ligadura del colédoco en la rata, la proliferación de colangiocitos es un proceso rápido que consigue ocupar el 30% del total de las células hepáticas, en tanto que en el hígado normal los colangiocitos representan el 2% de la masa celular hepática (Alvaro et al, 2006). La proliferación de colangiocitos es modificada por neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas. En particular, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) protagoniza la hiperplasia ductular. VEGF-A y VEGF-C aumentan en los conductos biliares de ratas con ligadura del colédoco ya que pueden ser secretados por los colangiocitos (Gaudio et al, 2006). Puesto que VEGF también regula la angiogénesis, parece lógico suponer que los colangiocitos proliferantes controlan, mediante la liberación de VEGF, la formación de un plexo vascular que suministre sangre para cubrir las demandas funcionales del epitelio biliar intrahepático proliferante (Gaudio et al, 2006)

La inflamación de origen biliar también puede inducir la apoptosis de los hepatocitos. La hiperproducción de citoquinas (TNF- $\alpha$ ) se ha asociado a la apoptosis hepatocitaria (Ding y Yin, 2004). En los síndromes colestásicos

destaca la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B ya que las elevadas concentraciones de ácidos biliares en los hepatocitos activan NF- $\kappa$ B (Miyoshi y cols. 2001; Zollner et al, 2005). La activación de NF- $\kappa$ B, a su vez, promueve la expresión de ligandos asociados a muerte celular por las células de Kupffer, como Fas y TNF, que son citotóxicos para el hígado (Nanji et al, 1999; Ding et al, 2004; Malhi et al, 2006).

Las células progenitoras de células hepáticas ó células madre también podrían desempeñar un importante mecanismo en la proliferación biliar. En lesiones hepáticas por D-Galactosamina la regeneración del hígado ocurre a expensas de células epiteliales biliares, denominadas células ovals, que derivan probablemente de los canales de Hering. Ya que las células biliares que proliferan expresan  $\alpha$ -1-fetoproteína, esta reactivación de genes fetales ha planteado la existencia de un proceso de retrodiferenciación en la colestasis (Kuhlmann 2006).

En la colestasis extrahepática la alteración hepática predominante es la marcada proliferación ductular con una infiltración inflamatoria portal moderada y apoptosis hepatocitaria (Sánchez-Patán et al, 2008a), constituyendo un modelo experimental de fibrosis biliar a largo plazo (Aube et al 2007; Sánchez-Patán et al, 2008a).

La fibrosis hepática post-ligadura del colédoco en roedores es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kerhenobich y Weissbrod, 2003; Li y Crawford, 2004). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular entre las que se incluye el colágeno (Bataller y Brenner, 2005; Rockey 2006; Gressner et al 2007). Un concepto fundamental respecto de la etiopatogenia de la fibrosis hepática es que éste proceso representa una respuesta de cicatrización por parte del organismo frente a otra agresión que es similar a la respuesta de otros órganos a una agresión recurrente (Rockey, 2006; Aller et al, 2008; Aller et al, 2010c).

El estrés oxidativo y enzimático y la infiltración por células inflamatorias en la colestasis obstructiva experimental podrían estar implicados en la patogenia de la proliferación de células epiteliales biliares y en la reduplicación y ramificación de los conductos y conductillos biliares (Kilicoglu et al, 2008). Así, se ha sugerido que el efecto hepatoprotector de la miel en ratas con ligadura del

colédoco podría ser secundario a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria (Kilicoglu et al, 2008).

Una intensa proliferación biliar en los espacios porta caracteriza a la colestasis extrahepática microquirúrgica a largo plazo en la rata. Los conductos biliares proliferantes invaden las zonas 1 y 2 del acino de Rapaport, pero no la zona 3 o pericentral (Aller et al, 2004) y ésta es la razón de que sea considerada una proliferación "atípica" (Alvaro et al, 2007).

En esencia, la respuesta fisiopatológica del hígado cuando se alteran tanto el flujo biliar (colestasis extrahepática) como portal (capilarización sinusoidal e hipertensión portal) es la atrofia del área hepática afectada y la hipertrofia del área no afectada (Black y Behrus, 2002). Histopatológicamente, el complejo atrofia-hipertrofia se caracteriza por fibrosis septal en el hígado atrófico con necrosis biliar en mosaico, apoptosis y proliferación ductular (Black y Behrns, 2002; Kilicoglu et al 2008).

Los colangiocitos son un epitelio biológicamente importante por los múltiples procesos celulares en los que participan, incluyendo el transporte de agua, iones y solutos (Boger y Larusso, 2007). Estas células epiteliales biliares han sido propuestas como la "diana" principal de los ácidos biliares en el hígado. Los ácidos biliares alteran significativamente la secreción, la proliferación y la supervivencia de los colangiocitos (Xia et al, 2006). Así, los ácidos biliares pueden antagonizar la pérdida de conductillos biliares inducida por la denervación colinérgica en la rata con ligadura de colédoco (Marzioni et al, 2006). Sin embargo, durante su intensa proliferación en colestasis obstructiva, los colangiocitos adquieren un fenotipo neuroendocrino y secretan múltiples sustancias, entre las que se incluyen neurotransmisores (serotonina) (Marzioni et al, 2005), neuropéptidos (péptidos opioides, como met-enkefalina) (Moezi et al 2006; Mombeini et al 2006; Nelson et al 2006; Marzioni et al 2007), hormonas (prolactina) (Bogorad et al 2006) y sus receptores (estrógenos) (Alvaro et al 2007) y factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento similar a Insulina (*Insuline-like growth factor*, IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*, HGF), TGF- $\beta$  y VEGF (Marzioni et al 2006; Alvaro et al 2007). La activación de células progenitoras hepáticas en el hígado colestásico es regulada por factores neuronales y

neuroendocrinos que modulan la biología de los colangiocitos malignos y no-malignos (Marzioni et al 2006).

La activación de las células estrelladas hepáticas es un factor patogénico clave en la producción de fibrosis hepática ya que los miofibroblastos resultantes son principalmente responsables del ensamblaje del tejido conectivo (Rockey, 2006; Gressner et al 2007; Proell et al 2007). Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y el mantenimiento de la activación de las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo, los neurotransmisores (Norepinefrina), la cascada Renina-Angiotensina, citoquinas (IL-4, IL-13), quimioquinas y factores de crecimiento, p.ej. el factor de crecimiento transformador  $\beta_1$  (*transforming growth factor*  $\beta_1$ ; TGF $\beta_1$ ) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (*connective tissue growth factor*; CTGF) (Sedlacek et al 2001; Rockey, 2006; Muddu et al 2007; Gressner et al 2007; Proell et al 2007; Friedman, 2008; Sánchez-Patán et al, 2008a). En particular, los radicales libres de oxígeno son capaces de activar NF- $\kappa$ B y así, la producción de citoquinas proinflamatorias (Aller et al 2004). Se establecería por tanto una relación entre estrés oxidativo, inflamación y fibrogénesis (Ramadori y Saile, 2004). Además, las células epiteliales que proliferan también son una importante fuente de CTGF en la rata con fibrosis biliar (Sedlacek et al 2001; Kassel et al 2012).

En la colestasis los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos y se ha propuesto que dicha apoptosis facilita a su vez la activación de las células estrelladas hepáticas (Canbay et al 2002). Por lo tanto, en la colestasis extrahepática los ácidos biliares están implicados tanto en la proliferación biliar como en la fibrogénesis (Isayama et al 2006). Además, la endotoxemia presente en colestasis (Ingoldby et al 1984) también podría exacerbar la fibrogénesis hepática. En ratones con colestasis extrahepática, la administración de LPS favorece la fibrogénesis hepática. Esta acción fibrogénica de LPS está mediada por CD<sub>14</sub> y TLR-4 (*Toll-like receptor-4*) y es estimulada por la proteína de unión a lipopolisacárido (*lipid binding protein*; LBP) (Isayama et al 2006). Ratones con ligadura del colédoco y déficit de CD4 no expresan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factor inductor de macrófagos (*Macrophage induction factor*, MIF), ni TGF $\beta$ , una citoquina con potente acción fibrogénica (Yang et al 2003; Isayama et al 2006). Aunque la retención de ácidos biliares por sí sola es suficiente para

## INTRODUCCIÓN

---

producir lesión hepatocelular, proliferación biliar, respuesta inflamatoria moderada y discreta fibrosis, cuando se asocia a estímulo por LPS, mediado por el receptor CD<sub>14</sub>, se activan macrófagos y aumenta la síntesis de agentes oxidantes y de citoquinas y, en consecuencia, la fibrosis (Isayama et al 2006).

Las células estrelladas hepáticas, al ser estimuladas por PDGF, por factor de crecimiento epitelial (*epithelial growth factor*, EGF) y TGFβ<sub>1</sub> expresan MMP-2, que induce su migración. La migración de las células estrelladas hepáticas es dependiente de Integrinas ya que la administración de anticuerpos anti-integrinas α<sub>1</sub> y α<sub>2</sub>, inhiben dicha migración (Yang et al 2003). Otros mediadores que activan a las células estrelladas hepáticas son neurotransmisores, como noradrenalina, que aumentan la expresión hepática de TGF-β<sub>1</sub> (Oben et al 2004), leptina (Ikejima et al 2002) y angiotensina II, que no solo aumenta la fibrosis hepática, sino que promueve el estrés oxidativo, la inflamación y la trombogénesis (Bataller et al 2005). Así, las células estrelladas hepáticas son posteriormente estimuladas de forma paracrina por trombocitos, leucocitos polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos que infiltran el hígado, pero también por células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y hepatocitos para diferenciarse en miofibroblastos (Szabo et al 2007; Gressner et al 2007; Sánchez-Patán et al, 2008a). Las células estrelladas hepáticas podrían también tener su origen en la médula ósea y adquirir el fenotipo miofibroblasto si está presente el medioambiente hepático estresor adecuado (Gressner et al 2007; Friedman, 2008).

El miofibroblasto hepático es la principal célula responsable de la promoción del depósito de colágeno fibrilar en el hígado colestásico (Bataller y Brenner, 2005; Gressner et al 2007). La gran plasticidad de los miofibroblastos hepáticos sugiere que incluso podrían coexistir diversos inmunofenotipos en la fibrosis biliar crónica, p.ej. portal, septal, intermedios o de transición y perisinusoidales (Cassiman et al 2002). La coexistencia de transición epitelio-mesenquimal del epitelio biliar o de los hepatocitos ha sido también propuesta en ésta patología (Sicklick et al, 2006; Henderson e Iredale, 2007; Friedman, 2008). La coexpresión de marcadores de células epiteliales y mesenquimales por algunas células del hígado adulto, sugiere que la existencia de transición epitelio-mesenquimal puede producirse también durante la vida post-natal. En los

hígados fetales la transición epitelio-mesenquimal constituye un mecanismo implicado en el desarrollo hepático (Chagraoui et al 2003). Asimismo, algunos hepatocitos adultos podrían ser capaces de sufrir una transición epitelio-mesenquimal ya que progenitores epiteliales hepáticos, esto es, las células ovals, expresan conjuntamente marcadores epiteliales y mesenquimales, en tanto que las células estrelladas hepáticas pueden ser inducidas para que expresen genes que las confieren un fenotipo epitelial (Sicklick et al 2006). Se explicaría así que conductillos biliares proliferantes en niños con atresia biliar expresen el marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA. Por lo tanto, la transición desde el fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal en la colestasis extrahepática constituiría un nuevo mecanismo productor de fibrosis (Zavadil et al 2005; Sicklick et al 2006).

Dada la plasticidad de las células estrelladas hepáticas y de las células del parénquima hepático (eje hepatocito-colangiocito), puede hipotetizarse que durante la evolución del hígado colestásico éstas células pueden expresar los mismos fenotipos que se suceden en la respuesta inflamatoria post-traumática (Aller et al 2004; Aller et al 2006): un fenotipo de isquemia-reperfusión (hipóxico), un fenotipo leucocitario (con respuesta pro y anti-inflamatoria) y, por último, un fenotipo angiogénico con proliferación biliar y fibrosis.

Durante estas fases evolutivas los colangiocitos podrían adoptar un comportamiento similar a las células tumorales con una complejidad metabólica progresiva (neuroendocrina), que se asocia a una complejidad estructural creciente. En éste supuesto, el tipo de tumor que se desarrolla sería benigno, a pesar de su importante capacidad para invadir el parénquima. Este tumor biliar "atípico", parece capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el hígado remanente o "hígado hepatocitario del huésped". Además, es posible que éste hígado compuesto por hepatocitos del huésped pueda participar en el desarrollo del tumor biliar por un proceso denominado "desmoplasia". Esto consiste en células fibroblásticas y matriz extracelular, elementos inflamatorios de respuesta inmune, representados por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, con angiogénesis, evidenciada por los vasos sanguíneos neoformados (Mareel y Leroy, 2003). En esencia, todos los elementos que constituyen la respuesta inflamatoria participan en ésta "reacción del hígado del huésped", que puede tener un objetivo trófico para el desarrollo del tumor colestásico biliar. La persistencia de ésta respuesta inflamatoria durante una

evolución más prolongada induciría un grado más intenso de desdiferenciación tumoral (Arias et al 2005; Arias et al 2006; Arias et al 2007), produciendo una transformación celular maligna como ocurre en el ser humano cuando se produce un cáncer de la vía biliar o colangiocarcinoma (Marzioni et al 2006; Yang et al, 2011)

### 5. KETOTIFÉN: UN FARMACO ESTABILIZADOR DE CELULAS CEBADAS

El fumarato de ketotifén se designa químicamente como 4-(1-metilpiperidin-4-ylideno)-4,9 dihidro-10H-benzo [4,5] ciclohepta[1,2-b] tiofén-10-1 hidrogeno(*E*)-butanodieno, su fórmula es  $C_{19}H_{19}NOS.C_4H_4O_4$  y su masa molecular  $425.5g.mol^{-1}$  (Mihun et al, 1984; Frag et al, 2011). Ketotifen es un potente y selectivo antagonista H1 no competitivo (Martin y Roemer, 1977; Abounassif et al, 2005) que actúa directamente sobre la membrana celular de las células cebadas estabilizando su estructura al evitar la fusión implicada en la exocitosis y, por lo tanto, previene la liberación de mediadores inmunológicos (Gilles et al, 2003; Greiner et al, 2003).

Ketotifén es bien absorbido tras su administración oral, alcanzando sus concentraciones plasmáticas un pico a las 2-4 horas (Grant et al, 1990). La biotransformación de ketotifén es realizada por los microsomas hepáticos utilizando cuatro rutas metabólicas en el ser humano: demetilación, N-oxidación, N-glucuronidación y cetorreducción (Le Bigot et al 1983; Breyer-Pfaff et al 2000). El aclaramiento plasmático del fármaco es bifásico, con una vida media de eliminación de 22 horas en el ser humano adulto (Grant et al, 1990). Sin embargo, existen diferencias de especie respecto del metabolismo de ketotifén y en la rata es metabolizado por los hepatocitos más rápidamente que en el ser humano ( $50 \text{ nmoles/h}/10^6 \text{ cél.}$  vs  $12 \text{ nmoles/h}/10^6 \text{ cél.}$ ) (Le Bigot et al, 1987).

Este fármaco produce mínimos efectos colaterales y su administración común por vía oral ha facilitado su uso en la clínica humana desde hace muchos años (Bassler et al, 2004; Repchinsky et al, 2001). Además, ketotifén puede ser



## INTRODUCCIÓN

---

administrado con seguridad por vía sistémica y numerosos estudios han permitido mejorar la permeabilidad cutánea de éste fármaco haciendo posible su aplicación tópica en asma y procesos alérgicos (Chiang et al, 1998; Bhattacharya y Ghosal; 2001; Inoue et al, 2005). Estos estudios permitiran en el futuro la aplicación local de ketotifén en el ser humano, administrandolo directamente en la zona cutánea lesionada para reducir la cicatrización excesiva, las contracturas patológicas y, en definitiva mejorar la calidad de vida de los pacientes. En particular, los hallazgos obtenidos al estudiar modelos experimentales en el cerdo permiten garantizar la realización en el futuro de estudios clínicos con ketotifén en los pacientes quemados.

Para facilitar su administración por via intraperitoneal y evitar su rápida biodegradación, ketotifén ha sido encapsulado en microesferas de Poli (D, L-lactido) y de Poli (D, L,-lactido-co-glicólido). Después de su administración intraperitoneal las microesferas se detectan en el tejido adiposo y se comprueba la liberación eficaz de ketotifén (Guerrero et al; 2008). El diseño de microesferas con ketotifén ha permitido utilizar con éxito ésta vía de administración en la profilaxis y el tratamiento de la respuesta inflamatoria secundaria a la hipertensión portal en la rata (Sanchez-Patán et al, 2008a; Sanchez-Patán et al, 2008b).

Ketotifén posee una actividad citoprotectora gastrointestinal y es antiinflamatorio (Schoch, 2003; Penissi et al 2003) y es un fármaco profiláctico muy útil en el asma bronquial, la rinitis alérgica y otras enfermedades alérgicas. En éste sentido, ketotifén ha demostrado su efectividad en la inflamación de las vias aereas al inhibir la síntesis y liberación de quimioquinas Th1 y Th2 por monocitos tras su estimulación por LPS. Así, disminuyen la quimioquina derivada de macrófagos (*Macrophage-derived chemokine; MDC*), una quimioquina de tipo Th2 implicada en el reclutamiento de células Th2 hacia las áreas de inflamación expuestas al alérgeno, pero también las quimioquinas Th1 monoquina inducida por Interferon- $\gamma$  (*monokine induced by interferon-gamma; MIG/CXCL9*) y proteina-10 inducible por interferón (*interferon-inducible proteína 10; IP-10/CXCL10*). Este efecto supresor de ketotifén sobre la liberación de MDC e IP-10 está mediado, al menos en parte, por la inhibición de la expresión de de p38- y ERK-*mitogen-activated proteína kinase* (MAPK)

(Hung et al, 2007). Ketotifén ha demostrado además su capacidad para eliminar la ascitis y las adenopatías abdominales en pacientes con Síndrome Hipereosinofílico Idiopático, una patología sistémica caracterizada por la infiltración eosinofílica que suele afectar al tracto gastrointestinal (Tang et al, 1997; Casella et al, 2011).

Además ha demostrado su acción terapéutica en el colon irritable, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Jones et al, 1998; Klooker et al, 2010; O'Sullivan, 2011; Ford y Talley, 2011), así como en diferentes modelos experimentales de colitis, reperusión intestinal y de ileo postoperatorio (De Jonge et al, 2004; Serna y Vergara, 2006; The et al 2009). La administración de ketotifén a ratas expuestas a la acción crónica de ovoalbúmina reduce significativamente la infiltración intestinal por células cebadas y el contenido de RMCP-II, bloqueando la hipermotilidad intestinal asociada a éste modelo de inflamación alérgica intestinal. Estos resultados avalan la relevancia de las células cebadas en la actividad motora del tracto gastrointestinal (Traver et al, 2010). Además, ketotifén también ejerce una acción beneficiosa en la diarrea producida por el cólera, que implica la liberación de mediadores pro-inflamatorios, como citoquinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Así se evidencia el importante papel que también tienen las células cebadas en la secreción intestinal (Rocha et al, 2003).

Ketotifén tiene la capacidad de reducir significativamente las alteraciones de la microcirculación que se producen en la mucosa intestinal como consecuencia de la inflamación producida por la administración de fármacos como la indometacina, lo cual indica los efectos de la degranulación de las células cebadas en la patología inflamatoria intestinal (Ruh et al, 2000).

La degranulación de las células cebadas pancreáticas tienen un importante papel en la activación de la respuesta inflamatoria local y sistémica en las fases iniciales y en la progresión de la pancreatitis aguda (Lopez-Font et al, 2010). Por ello, la administración de fármacos estabilizadores de mastocitos, como ketotifén, en ratas con pancreatitis aguda disminuye el acúmulo de células cebadas en el páncreas, reduce el edema, la infiltración por neutrófilos, los niveles séricos de amilasa y la actividad de mieloperoxidasa. La acción

protectora de Ketotifen en ésta patología se atribuye al bloqueo de la degranulación de las células cebadas y, por tanto de la liberación de mediadores proinflamatorios, y a la estimulación de la síntesis de NO (Yönetçi et al, 2001; Lopez-Font et al, 2010).

Curiosamente, ketotifén también ejerce efectos metabólicos beneficiosos, lo cual ha permitido plantear la estabilización de las células cebadas como una nueva opción terapéutica en la obesidad y la diabetes (Wang y Shi, 2011). El tejido adiposo blanco de los pacientes obesos contiene un gran número de células cebadas y los niveles séricos de triptasa en estos pacientes son también más elevados que en sujetos normales. Por eso, la estabilización de las células cebadas con ketotifén aumenta el gasto energético, mejora la sensibilidad periférica a la insulina y reduce la ganancia de peso corporal (Wang y Shi, 2011). Igual que los macrófagos y los linfocitos T, los mastocitos son células inflamatorias que participan en la etiopatogenia de múltiples enfermedades inflamatorias, como las alteraciones cardiovasculares y los trastornos metabólicos. De hecho, en modelos experimentales se ha comprobado recientemente la participación de las células cebadas en la obesidad y la diabetes tipo 2 (Wang, y Shi, 2011). Aunque los mecanismos por los que las células cebadas participan en la fisiopatología de éstas enfermedades metabólicas aún no se conocen completamente, la administración de fármacos estabilizadores de estas células constituyen una esperanza para estos enfermos que padecen estas patologías inflamatorias crónicas de gran prevalencia en la actualidad (Zhang y Shi, 2012; Xu y Shi, 2012).

La estabilización de las células cebadas con diversos fármacos, entre ellos ketotifén mejora la supervivencia en los pacientes con sepsis la inhibir la liberación extracelular de *high mobility group box 1* (HMGB1) a la circulación sistémica por las células apoptóticas (Ramos et al, 2010). En un modelo de peritonitis séptica por punción y ligadura del ciego se ha demostrado que la degranulación sistémica de las células cebadas aumenta la mortalidad (Seeley et al, 2011) Estos hallazgos confirman la participación de las células cebadas regulando la muerte celular en la sepsis y representa una alternativa terapéutica para la patología infecciosa en la clínica humana que podrá ser utilizada en un futuro próximo (Ramos et al, 2010).

Por último, ketotifén ha demostrado su efectividad en diversas patologías fibróticas, como son la estenosis esofágica secundaria a quemaduras por álcalis (Yukselen et al, 2004), en el edema sólido persistente del acné (Jungfer et al, 1993), en la fibrosis cutánea (Walter et al, 1990; Gallant-Behn et al, 2008) o la urticaria (Egan et al, 1997), en las patologías fibróticas de la cicatrización (Kischer y Bailey 1972; Garbuzenko et al 2002; Gallant-Behm et al, 2008), en la esclerodermia (Claman, 1990; Dunn L, 2013), en la mastocitosis sistémica (Pova et al, 1991), en las contracturas articulares post-traumáticas (Monument et al, 2010; Monument et al, 2012), en el tratamiento de la infertilidad masculina (Oliva et al, 2006) y en el tratamiento del asma (Schwarzer et al, 2004) o de los procesos inflamatorios de la conjuntiva (Kidd et al, 2003; Woerly et al, 2003). La hiperplasia de células cebadas, es un hallazgo muy común en el tejido fibroso y en patologías fibróticas, tanto sistémicas, como la artritis reumatoide, la fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, como cutáneas (queloides, cicatrices hipertróficas, fibroproliferativas y retráctiles (Lee y Vijayasingam; 1995; Harunari y cols., 2005).

Las células cebadas sintetizan gran cantidad de mediadores profibróticos, como proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, muchas de las cuales ejercen efectos mitogénicos sobre los fibroblastos y los miofibroblastos. Además, las células cebadas estimulan la proliferación y la contractilidad de los fibroblastos, así como la síntesis de colágeno, la contracción de las heridas y la remodelación tisular (Kischer y Bailey 1972; Skold et al 2001; Garbuzenko et al 2002; Moyer et al 2004; Iba et al 2004). En particular, las células cebadas se localizan en íntima relación con los fibroblastos, miofibroblasto y con neuronas sensitivas en la piel, lo cual permite sugerir la implicación de estas células en neuroinflamación (Alving et al, 1991; Hart et al, 2005)

La estabilización de las células cebadas con ketotifén parece afectar al hipotético "eje neural- célula cebada - miofibroblasto" y, subsiguientemente a la expresión del fenotipo hipercontractil, al modular la composición del medioambiente durante la cicatrización cutánea y articular (Hildebrand et al 2007; Gallant-Behn et al, 2008). Estas evidencias experimentales, han permitido proponer la implicación de éste eje en procesos patológicos en múltiples tejidos asociados con excesiva contracción y depósito de matriz extracelular, así como sugerir la administración de ketotifén como profilaxis y

## *INTRODUCCIÓN*

---

tratamiento para reducir la contracción excesiva de la cicatriz, así como la fibrosis en la clínica humana (Gallant-Behn et al, 2008).

## ***II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS***

### **1. HIPÓTESIS**

La colestasis extrahepática causa fibrosis biliar e hipertensión portal. En ambas patologías, los mecanismos fisiopatológicos implicados tienen naturaleza inflamatoria. Ya que las células cebadas normalmente poseen amplia distribución esplácnica, se puede sospechar su participación en la respuesta inflamatoria esplácnica secundaria a la colestasis extrahepática, así como su respuesta al tratamiento con Ketotifen, un fármaco estabilizador de su membrana.

Para demostrar esta hipótesis, se utilizó un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata en el cual se han estudiado principalmente las alteraciones en la distribución esplácnica de células cebadas tanto mucosas como conectivas, así como su respuesta al tratamiento con Ketotifen, en un periodo evolutivo considerado crónico. La administración de este fármaco antiinflamatorio, inhibe la liberación de sustancias mediadoras de la inflamación, tanto almacenadas como sintetizadas de novo por las células cebadas y, en consecuencia, disminuye las alteraciones esplácnicas secundarias a la colestasis extrahepática.

### **2. OBJETIVOS**

- 1.- Demostrar en un modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica la existencia de una alteración en la distribución esplácnica de células cebadas mucosas y conectivas.
- 2.- En este modelo experimental de ictericia obstructiva, el tratamiento con Ketotifen, modifica la redistribución esplácnica de las células cebadas así como reduce las alteraciones inflamatorias asociadas a la acción de sus mediadores.
- 3.- El tratamiento con Ketotifen, permite determinar, en la ictericia obstructiva experimental, los mecanismos etiopatogénicos inflamatorios propios de las células cebadas mucosas y conectivas.



### ***III MATERIAL Y MÉTODOS***

### 1. MATERIAL

#### 1.A. ANIMALES

Se utilizaron 65 ratas macho adultas de la cepa Wistar procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación que posee Harlan Interfauna Ibérica S.L. Sant Feliu de Codines (Barcelona). Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*, con pesos corporales comprendidos entre 215 y 335 gramos ( $260,934 \pm 38,754$  g).

#### 1.B. INSTALACIONES

##### 1.B.1. Animalario

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario que la Universidad Complutense de Madrid (UCM) posee en la Facultad de Medicina. Dicho Animalario es un Centro de Asistencia a la Investigación con registro nº 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (RD. 53/2013). El Animalario de la UCM cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como también con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anejos para la manipulación y toma de muestras y alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro dentro de cajas de Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona).

### **1.B.2. Unidad de Microcirugía**

La técnica quirúrgica en la que se fundamenta el modelo se realizó en la Unidad de Microcirugía de la Facultad de Medicina de la UCM, en una sala que dispone de:

- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm y sillas.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Lámpara Fase de brazo doble adaptable, con una bombilla de 100 watios Osram Concentra.
- Centrífuga refrigerada superspeed Du Pont Instrument (GIRALT Sorval® RC-5B).
- Balanza precisión para pesado de los animales Jadever LPW-1260 nº certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC nº serie 211069.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.

### **1.B.3. Sala de sacrificio y procesamiento de muestras**

Dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Centrífuga.
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.
- Recipiente para inmersión de muestras en nitrógeno líquido.

- Pinza para inmersión de las muestras.

### **1.B.4. Área de conservación de muestras**

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en un congelador que conserva las muestras a – 80°C.

### **1.B.5. Eliminación de residuos biológicos**

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid). La eliminación y destrucción de los residuos biológicos fue llevada a cabo por la empresa CONSENUR SL.

## **1.C.FÁRMACOS**

### **1.C.1. Anestésicos**

- Ketamina (Imalgene®1000 . Laboratorios Merial, S.A.).
- Xilacina (Rompun® solución 2% . Bayer HealthCare ).

### 1.C.2. Ketotifen

- Ketotifen: fumarato de (4-(1-metil-4-piperidileno)-4*H*-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-*b*]tiofen-10(9*H*)-uno (Sigma Chemicals, St Louis, USA)

### 1.C.3. Otros fármacos

- Cefuroxima (D.C.I.) (sódica), 500 mg. (Cefuroxima Normon 500mg EFG Lab. Normon S.A. Madrid )/ Ceftazidima 50mg/kg dos veces semana RATIOPHARM ESPAÑA.
- Fitomenadiona, vit. K 1 ampollas 1,0 ml con 10 mg (Konakion ® mm Roche Farma, S.A. Madrid).
- Buprenorfina (Buprex®).

## 1.D. MATERIAL

### 1.D.1. Instrumental quirúrgico

#### 1.D.1.A Pinzas

- Clamp de paños BACKHAUS de 13.3 cm (2)
- Disección con dientes de 13cm (1)
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1)
- HALSTED Mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2)
- HALSTED Mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2)
- Pinza de Heiss recta (1)
- Pinza de Heiss curva (1)
- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm. (1)
- Pinza de microcirugía curva de 10,5 cm.(1)

1.D.1.B Porta-agujas Mayo-Hegar de 12,7 cm. (1)

1.D.1.C Tijeras

- De Metzenbaum curva de 14 cm (1)
- De Mayo recta de 14cm (1)
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm. (1)

### **1.D.2. Material de sutura y ligadura**

- Seda trenzada como ligadura 3/0 Silkam®. B. Braun España.
- Seda negra trenzada como ligadura 7/0 Silkam®. B. Braun España.
- Sutura de VICRYL (poliglactina 910) aguja curva 3/0. Ethicon Inc.
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 4 /0 Silkam®. B. Braun España.

### **1.D.3. Material quirúrgico complementario**

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 ½ (King™ Amebil S.A. Vizcaya. España)
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla 7 ½ (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK)
- Gasas de 10 × 10cm . (Envase de 10 unidades Texpol® .Manresa. España)
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages,S.A. Barcelona. España)

### **1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras**

- Guantes de protección frente a mordedura de animales
- Bloque de plastilina de 10 × 2 × 3 cm
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit™ II (Becton Dickinson S.A. Fraga. Huesca. España )
- Agujas de tipo Luer 20G 0,91×25,4 mm (monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Agujas de tipo Luer 21G 0,82×38,1 mm (monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Agujas de tipo Luer 25G 0,51×15,8 mm (monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Hoja de bisturí de acero estériles del nº 11 (Albion Surgical Limited Sheffield. England)
- Solución Salina isotónica: ClNa, 0.9 g/100ml. Envase 10 ml B.Braun.
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 litros ( Sanipick Plastic SA. Madrid)
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España)
- Guantes de protección frente frío Midera 10

### **1.D.5. Material de laboratorio**

- Pipetas Pasteur de 1 ml.
- Micropipetas JENCONS automáticas variables de 0.5-10 µl, 5-50 µl, 200-1000 µl (Labsystem) y puntas de pipetas desechables (Labcenter)
- Tubos de centrifuga 10ml (BD Vacutainer™. BD Vacutainer Systems. Plymouth. UK).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

- Microtubos para muestras de suero (Eppendorf Ibérica, S.L. Madrid).
- Tubos de polipropileno de 50 ml para muestras de tejido (BD Falcon™ NY USA ).

### **1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO**

#### **1.E.1 Procesado de muestras**

- Centrífuga angular Nahita modelos 2610 ref. 2610000 OF.
- Balanza analítica de precisión AB 204 Mettler Toledo nº serie:1113043273 (Mettler-Toledo S.A.E. L'Hospitalet de Llobregat Barcelona).

#### **1.E.2 Estudio bioquímico en suero y en líquido ascítico**

- Autoanalizador Olympus AU400 nº serie 311267. Olympus Optical España S.A.

#### **1.E.3 Determinación de los niveles de mediadores inflamatorios en hígado, ileon y ganglios linfáticos mesentéricos**

- Homogeneizador eléctrico Polyton. (Brinkmann Instruments, Inc. Westminster, NY. USA).
- Sonicador.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.

#### **1.E.4. Estudio del recuento de células cebadas mucosas y conectivas esplácnicas.**

- homogeneizador eléctrico (Polyton; Brinkmann instruments, Westminster, NY)
- Centrífuga Biofuge 17RS (Heraeus Sepatech)
- Sonicador Virsonic 5 (Virtis)



- Espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia)

### 1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO

#### 1.F.1 Estudios bioquímicos en suero

- **Bilirrubina total y directa:**

- *Total Bilirubin Olympus System Reagent y Direct Bilirubin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Acidos biliares (AB)**

- *Acidos biliares* : Kit de método enzimático colorimétrico de ácidos biliares (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863)

- **Fosfatasa alcalina (FA)**

- *ALP Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6104).
- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Proteínas totales**

- *Tot Proteins Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. 80016)

- *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300)
- *Kit* comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, Reino Unido.

### **1.F.2. Niveles de Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (*Calcitonin gen related peptide*, CGRP) e Interleuquina 13 (IL-13) en líquido ascítico:**

#### **- Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (CGRP)**

- Rat CGRP Enzyme Immunoassay Kit (ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay)  
(SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France)

#### **- Interleuquina 13 (IL-13)**

- Rat IL-13 Enzyme Immunoassay Kit (ELISA)  
(Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain).

### **1.F.3. Niveles de citoquinas en tejidos esplácnicos:**

- Tampón de lisis que contiene 1 mmol/l de fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), y 1 µg/ml de pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipain (Sigma Chemical Company) y leupeptina, en tampón fosfato a pH 7,2 (Biofluids, Rockville, Md.) conteniendo un 0,05% de azida sódica (Sigma Chemical Company).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA) kits para TNF $\alpha$ , IL-10, IL-13, *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP-1), (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

### **1.F.4. Valoración de células cebadas mucosas y conectivas esplácnicas:**

#### **1.F.4.a. Valoración de células cebadas mucosas (RMCP-II).**

- Kit comercial de ELISA para la determinación de la quimasa RMCP-II (Rat Mast Cell Protease II Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (Moredun Scientific Limited)

- RMCP-II para curva patrón
- PBS (Fosfato 0.1M, NaCl 0.15M) estéril
- Reactivo Bradford (azul de Coomassie) (BIO-RAD protein assay)
- Solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) 1mg/ml
- Nieve carbónica

#### **1.F.4.b. Valoración de células cebadas conectivas (RMCP-I)**

-Tinción de Azul de toluidina 0,5%

-Azul de toluidina.....0,5g

-Agua destilada.....100 ml

-Tubos de 50ml de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park; NJ)

## 2. MÉTODOS

### 2.A. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se ha incorporado a nuestro ordenamiento legal con fecha de 6 de Febrero de 20013 en el R.D. 53/2013, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Aller et al. 2009a).

Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona), en condiciones estables de luz y oscuridad, distribuidos en ciclos de 12 horas (de 8 a 20 horas y de 20 a 8 horas respectivamente), a una temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C y con una humedad relativa de 65-70 %. Un sistema de aire acondicionado garantizó la renovación y la climatización del aire. Se alimentaron con una dieta sólida estándar para roedores de laboratorio (rata AO4 dieta de mantenimiento: 17,6% proteínas, 43,3% almidón 2,5% lípidos, Panlab, España) y agua *ad libitum*) (Aller et al. 2009a).

### 2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL

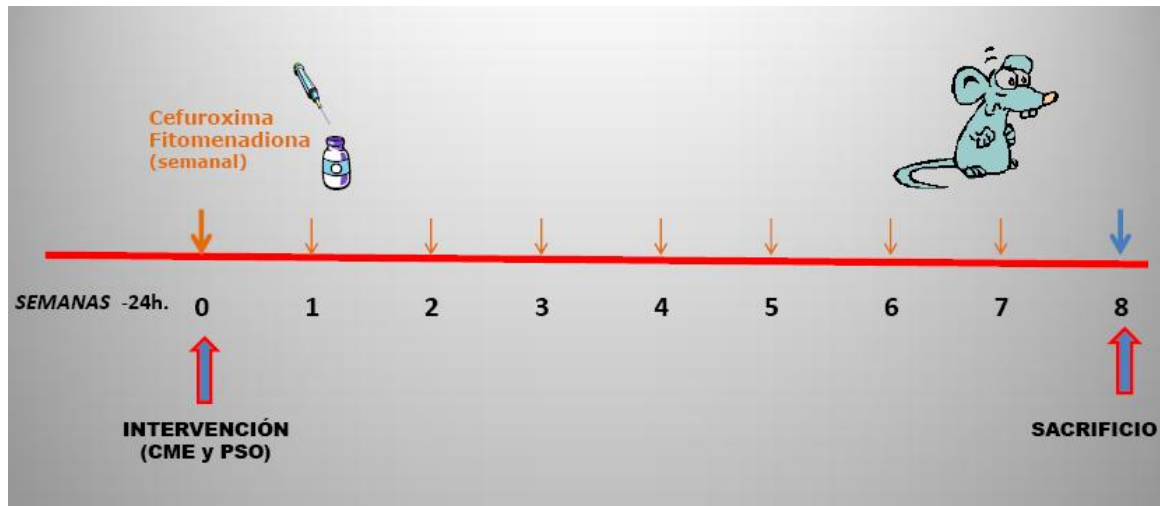
Las ratas fueron agrupadas aleatoriamente para su estudio en los siguientes grupos(Figura 3):

- **Grupo SO (n=15):** Animales pseudooperados en los que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención.

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

- **Grupo CMQ (n=20):** Animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, que consiste en la resección individualizada de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos que constituyen el hígado de la rata, en continuidad con el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención.
- **Grupo SO+K (n=13):** Animales pseudooperados en los que se realiza laparotomía media y disección de la vía biliar extrahepática y que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas de la intervención. A éstos animales se les administra por vía oral Ketotifen disuelto en el agua de bebida (10mg/kg/día) desde las 24 h previas a la intervención hasta que son sacrificadas..
- **Grupo CMQ+K (n=17):** Animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, que se sacrifican entre las ocho y las nueve semanas y a los que se administra por vía oral Ketotifen disuelto en el agua de bebida (10mg/kg/día) desde las 24 h previas a la intervención hasta que son sacrificadas.



**Figura.3:** Esquema cronológico de los pasos a los que se somete a las ratas pseudo-operadas (SO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ) a lo largo de las ocho semanas de evolución del modelo experimental.

### 2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA

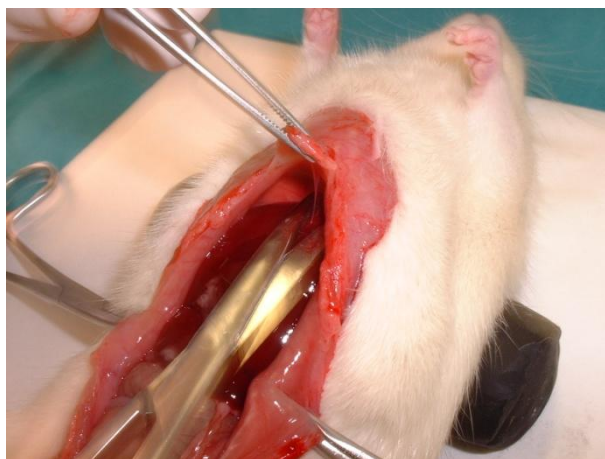
El principal objetivo de la anestesia cuando se utilizan animales de laboratorio, es de carácter ético y consiste en evitarles el dolor y el sufrimiento innecesarios. Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de Investigación, debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y el ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo distrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller y Nava, 2009).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la parenteral. Respecto a ésta última vía, en la última década se ha generalizado en roedores la administración de combinaciones de

fármacos y, en particular la asociación del anestésico disociativo Ketamina con el analgésico alfa-2 agonista Xilacina para aquellas intervenciones quirúrgicas de duración media (de 10 a 60 minutos) en las que se precisa un plano de anestesia quirúrgica profunda (Aller y Nava, 2009). Por éstas razones, en el presente trabajo la inducción y el mantenimiento anestésico se realizaron mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (80 mg/Kg) y Xilacina (12 mg/Kg).

### 2. D. TÉCNICA QUIRÚRGICA DE PSEUDO-OPERACIÓN

Con la rata en decubito supino se realiza una laparotomía media xifopubiana (Figura 4). Las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%) , y son desplazadas hacia el lado izquierdo del animal. A continuación y, tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se secciona el ligamento falciforme, situado entre los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figuras 4 y 5).



**Figura 4..** *Laparotomía media y sección del ligamento falciforme*

Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Lorente y cols. 2009). Tras disecar el

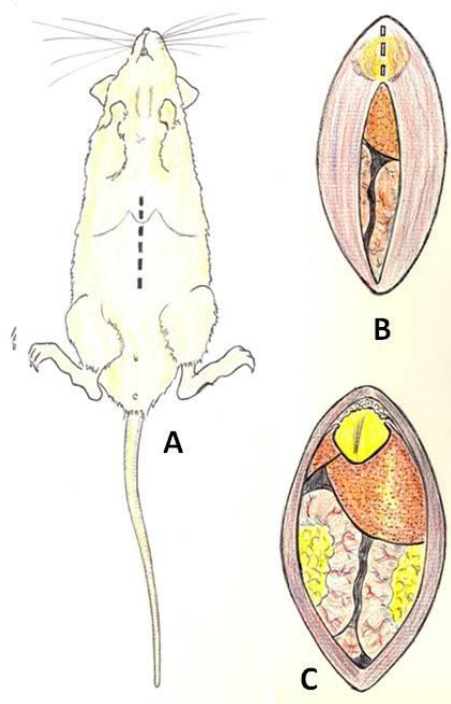
colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en 2 planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible Vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0.

### **2. E. TÉCNICA DE COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRÚRGICA**

El parénquima hepático en la rata está constituido por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) y cada uno de ellos posee una vascularización portal y arterial y un drenaje venoso y biliar independientes (Lorente y cols. 2009). Esta característica anatómica permite reseca los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller y cols. 1993; Aller y cols, 2009b)(Figura 6)

Tras anestesia intraperitoneal de ketamina (80mg /Kg) y xilacina (12 mg/Kg), con el animal en decúbito supino, se realizó una laparotomía media xifopubiana y se seccionó el ligamento falciforme.

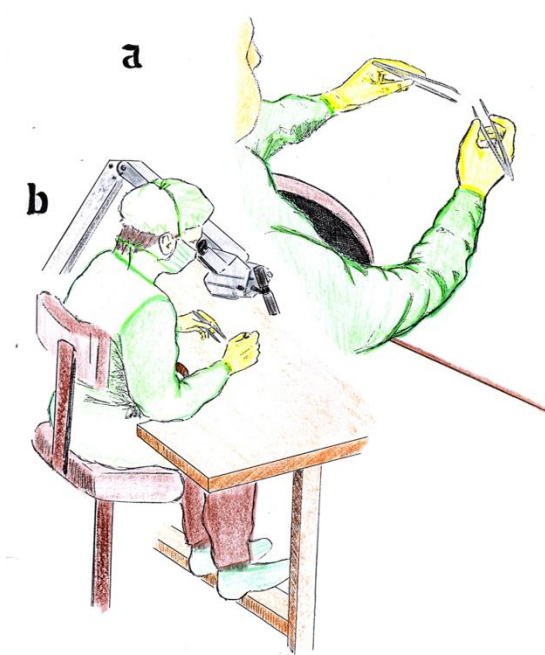




**Figura 5:** A: Laparotomía Xífo-pubiana. B y C Apertura laparotómica con exposición del apéndice Xifoideas, hígado y asas intestinales.

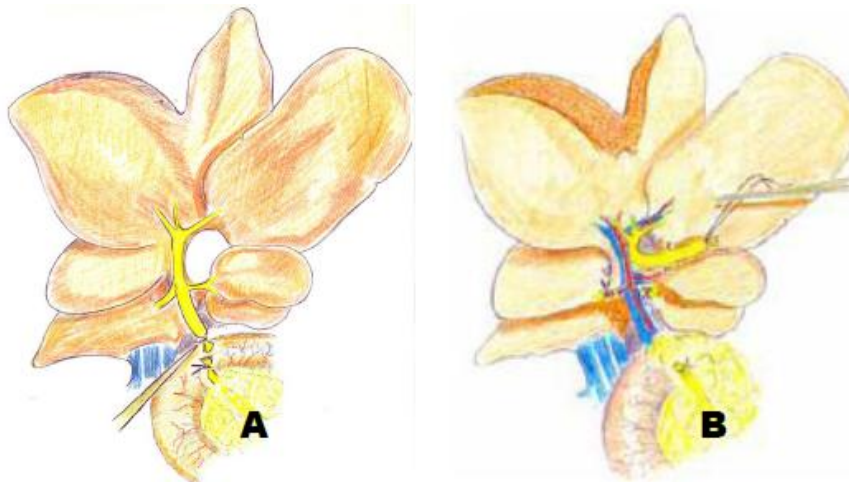
A continuación se extrajeron las asas intestinales, desplazándolas hacia el lado izquierdo del animal y se protegieron con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%). Después de colocar un bloque de plastilina en la zona dorso-lumbar los lóbulos hepáticos superiores se evirtieron sobre el tórax y también se cubrieron con una gasa empapada en suero salino. Estas maniobras permitieron una correcta exposición de la totalidad de la vía biliar extrahepática. A continuación se seccionan el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC), y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.

Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Aller y Arias, 2009), ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos.



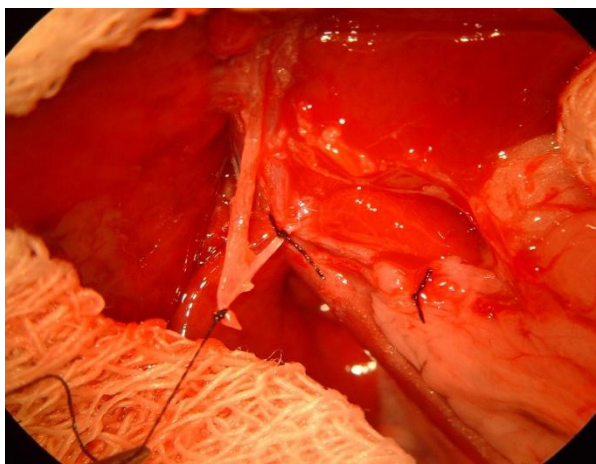
**Figura 6:** a: Técnica de manejo de las pinzas de microcirugía. B: Técnica de utilización del microscopio binocular

La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática. Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata. El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC. (Figura 7)



**Figura 7:** A: Ligadura y sección distal de la vía biliar principal. B: Separación de la vía biliar principal y disección craneal tras la sección distal.

Después de disecar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático(Figura 8) La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma.



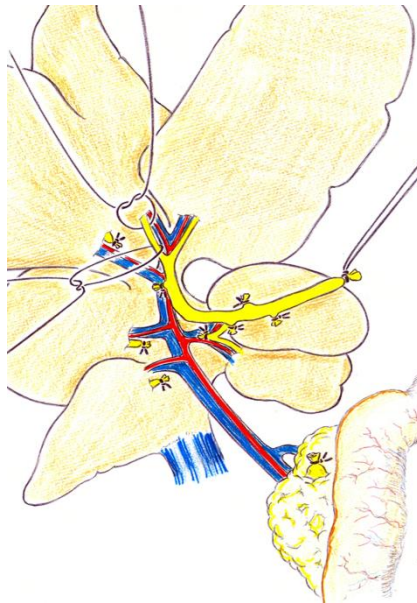
**Figura 8:** Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares

## MATERIAL Y MÉTODOS

*procedentes del lóbulo caudado(LC).*

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria hepática, y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del lóbulo medio (LM).

Estos últimos se disecan y se ligan independientemente. Por último, se diseca, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI ( Aller y cols. 1993; Aller y cols, 2009b)(Figura 9).



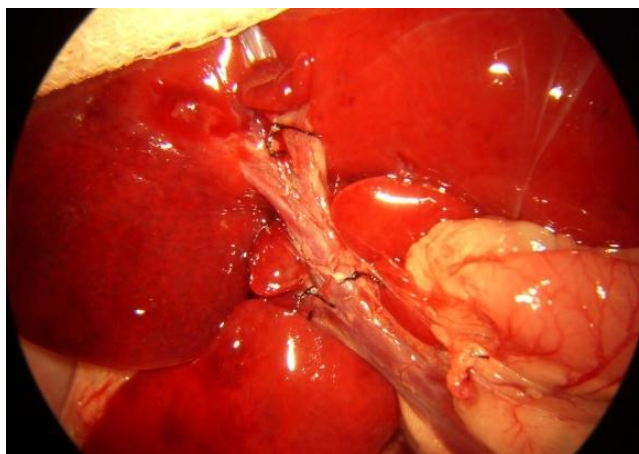
**Figura 9:** Aspectos del hilio hepático de la rata tras la sección microquirúrgica de los ductos biliares que drenan a los cuatro lóbulos hepáticos en continuidad con el conducto biliar principal.

Previo comprobación de la integridad de la vascularización portal y arterial de los lóbulos hepáticos, así como de la la inexistencia de sangrado procedente de alguna lesión inadvertida del parénquima hepático,(Figura 10) se reintegran las asas

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

intestinales al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con continua reabsorbible vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 4/0, y de la piel con sutura continua de seda de 4/0.



**Figura 10:** Exposición del hilio hepático apreciando la arteria hepática y la vena porta tras la extirpación de la vía biliar principal y de los ductos lobares

### 2. F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención las ratas se colocaron en una caja de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio (Panlab), que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperan de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1989; Aller y Nava, 2009), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth y Flecknell, 2004).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

Además en los roedores, es importante controlar la respiración durante el postoperatorio (p.o.) inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este periodo. Esta complicación es especialmente peligrosa ya que suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes fluidos por evaporación, lo cual se agrava ya que las ratas generalmente son incapaces de ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas del post-operatorio. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se hayan recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0.18% salino) o salina (0.9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller y Nava, 2009).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor post-operatorio. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de p.o. (Aller y Nava, 2009). Buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria.

Los animales fueron sacrificados a las 8-9 semanas del período post-operatorio, durante el cual se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro (Ceftazidima; 50 mg/kg; dos veces a la semana) y Vitamina K1 (Fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller et al. 2009b).

Ketotifen, un fármaco estabilizador de la membrana de los mastocitos, se administró en el agua de bebida tras ser disuelto a una concentración de 0.15mg/ml

que aporta una dosis del fármaco de 10mg/kg/día (Serna y cols. 2006) desde la sexta semana del p.o. hasta que las ratas fueron sacrificadas la 8ª-9ª semana del p.o. Se comprobó diariamente la cantidad de agua ingerida por cada rata para asegurar que estaban recibiendo niveles terapéuticos del fármaco (dosis umbral terapéutica de 10mg/Kg/día, por lo que eran necesarios 16,6 ml/día para una rata de 250g de peso corporal). Las ratas que ingerían menos agua de la necesaria para mantener niveles plasmáticos terapéuticos de Ketotifen fueron rechazadas para el estudio.

### **2. G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES**

Concluido el tiempo de evolución previsto para su estudio (8-9 semanas), se procedió a la anestesia de los animales con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (12 mg/kg) por vía intraperitoneal para su estudio y posterior sacrificio. Tras laparotomía media, el líquido ascítico es aspirado con una jeringa esteril, se mide su volumen y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos para separar las células peritoneales. A continuación, se divide en tres alícuotas y se conserva a -42 °C hasta su utilización para determinar diferentes mediadores.

#### **-Recogida de muestras histológicas para determinaciones de mediadores inflamatorios.**

**Extracción de una muestra de hígado.** Una muestra del lóbulo medio (LM) hepático fue introducida en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente fueron almacenados en un congelador a -42°C hasta su estudio.

**Extracción del Complejo Linfático Mesentérico Superior.** Los ganglios que componen el Complejo Linfático Mesentérico Superior en la rata se extirparon y se pesaron, y a continuación se introdujeron en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente se almacenaron en un congelador a -42°C hasta su estudio.

**-Extracción del íleon.** Se tomó una muestra de íleon terminal, a 1 cm de la unión ileocecal. Una vez extraído se pesó, y a continuación se introdujo en tubos Eppendorf, que se conservan en nieve carbónica -y posteriormente en un congelador a -42 °C- hasta su estudio.

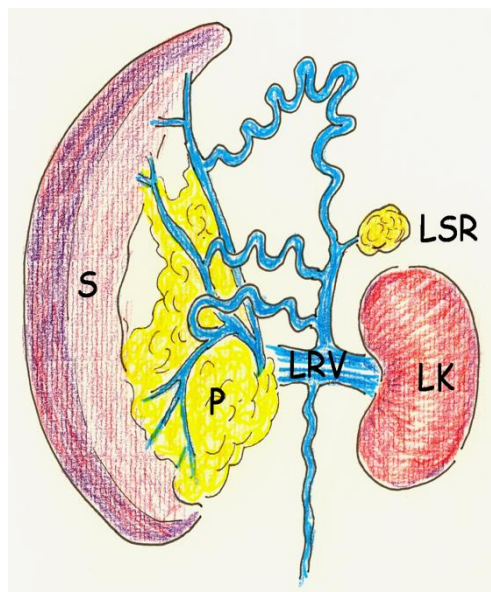
### **-Recogida de muestras para estudio de la infiltración tisular esplácnica por células cebadas**

Durante la necropsia de los animales se procedió a la resección del hígado, individualizándose sus lóbulos anteriores y posteriores, y se tomó una muestra del lóbulo medio derecho, que se transfirió a un tubo que contenía Formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Además, se extrajeron muestras de íleon terminal, se eliminó su contenido mediante la perfusión intraluminal de solución salina isotónica y se introdujeron en tubos que contenían formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Por último, también se extirparon el bazo y los testículos para ser registrado su peso.

## **2. H.DESARROLLO DE ASCITIS Y CIRCULACIÓN COLATERAL ESPLÉNORRENAL**

Tras laparotomía media se estudió el área en la que se desarrolla fundamentalmente la circulación venosa colateral porto-sistémica en la rata, esto es el area esplenorrenal. En el p.o. de éstos animales se forman la vena *esplenorrenal craneal* (anterior o proximal), y la *esplenorrenal caudal* (posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda (figura 11).





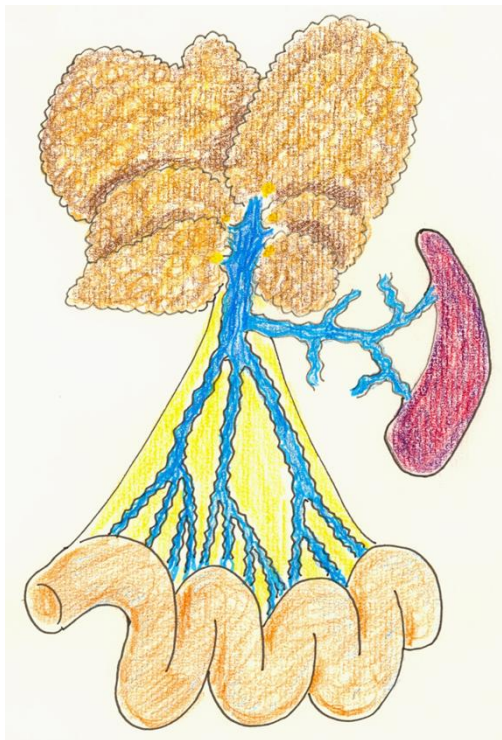
**Figura 11:** Clases de circulación colateral esplenorrenal en la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. S: bazo. P: páncreas. LRV: vena renal izquierda. LK: riñón izquierdo. LSR: glándula suprarrenal izquierda.

### 2. I. VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Aller y cols, 2001) (Figuras 12 y 13):

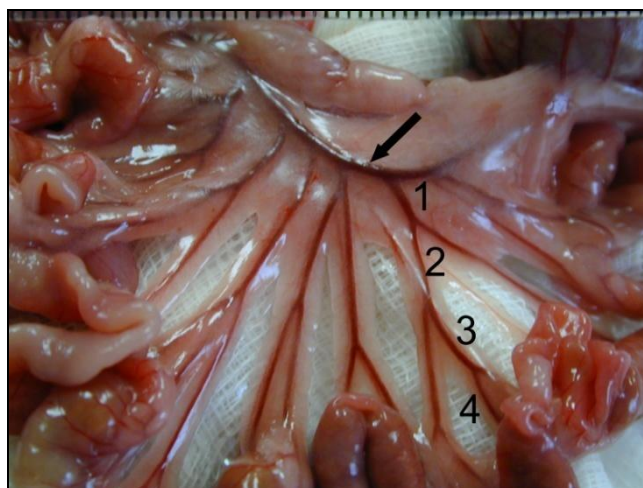
- **Grado 0:** aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- **Grado I:** dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje de la vena mesentérica superior.

- **Grado II:** dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.



**Figura. 12:** Representación esquemática de la vasculopatía venosa mesentérica de grado II de una rata con colestasis microquirúrgica a las ocho semanas de la intervención

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior (Figura 13). Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino (íleon y ciego) (Castañeda y cols, 2000).



**Figura 13.** *Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.*

### - 2.J. BIOQUIMICA SANGUINEA

Tras realizar un estudio macroscópico de la cavidad abdominal, medir la presión portal y valorar los signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal, como son el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica y de circulación venosa colateral, se procedió a la extracción de sangre de la vena cava inferior infrahepática, obteniéndose entre 5 y 8 ml de sangre en cada animal (Figura 14). Esta maniobra deja al animal exangüe, falleciendo por shock hipovolémico. La sangre se conservó refrigerada en hielo (4°C), y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el suero que, tras dividirse en tres alícuotas, se conservó -42 °C hasta su utilización para determinar diferentes marcadores bioquímicos.



**Figura. 14:** Extracción de sangre venosa de rata procedente de la vena cava inferior tras realización de laparotomía xifo-púbica y desplazar el paquete intestinal hacia el lado izquierdo exponiendo el espacio retroperitoneal.

### **-Bilirrubina total y directa**

Las concentraciones séricas de bilirrubina total y directa se determinaron por una técnica fotolorimétrica, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112, respectivamente). Esta técnica consiste en una diazoreacción basada en el principio de Jendrassik y Gróf (Doumas y cols 1985). En medio ácido la *bilirrubina conjugada* reacciona con una sal para formar azobilirrubina (azopigmento). Esto es lo que se denomina *bilirrubina directa*. Si a la muestra de suero y reactivo añadimos una sustancia aceleradora (cafeína y agentes surfactantes) conseguimos que reaccione el total de la *bilirrubina*, denominando a la diferencia

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

entre la total y la directa fracción indirecta (no conjugada). La concentración de *bilirrubina* presente en el plasma es proporcional a la concentración de azopigmento que se produce (Higgins y cols. 2006). La utilización de un reactivo compuesto por ácido Sulfanílico, ácido Clorhídrico y Dimetil sulfóxido (DMSO) permite la formación de azobilirrubina por una reacción de diazotación, que es de color rojo cereza. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 555 nm (530-580) y a 20-25°C (Martinek y cols, 1966).

### **-Ácidos biliares**

Para la determinación de las concentraciones séricas de ácidos biliares se utilizó un método cinético fotolorimétrico enzimático (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863). En una primera reacción los ácidos biliares son oxidados por la enzima 3- $\alpha$  hidroxiesteroide dehidrogenasa, con la subsiguiente reducción del Thio-NAD a Thio-NADH. La tasa de formación de éste último compuesto se valora midiendo los cambios en la absorbancia específica en 405 nm.

### **-Fosfatasa alcalina.**

La fosfatasa alcalina se determina utilizando un test cinético fotolorimétrico según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)* (Olympus Irlanda ref. OSR6104), que se basa en la hidrolización de los ésteres del ácido fosfórico en medio alcalino, produciendo fosfato inorgánico y el correspondiente resto orgánico con el que se había esterificado. Para su valoración se utiliza un test cinético optimizado con el que se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto a una longitud de onda de 405 nm y a 25 °C, 30°C y 37°C, siguiendo el protocolo DGKC (Annon y cols, 1989)

### **-Proteínas totales.**

Las proteínas totales se determinaron mediante el test colorimétrico "Biuret", basado en que los grupos -CO-NH- unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio alcalino, siendo la más representativa y

simple la que da con el reactivo de Biuret. Se valora la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Es en la actualidad, constituye el método más exacto y simple para la determinación de las proteínas totales (Henry y cols, 1957; Peters y cols, 1968).

### **2. K. MARCADORES INFLAMATORIOS EN LIQUIDO ASCITICO.**

Para valorar las concentraciones de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin gen related peptide*, CGRP) e IL-13 en el líquido ascítico se utilizaron técnicas *ELISA*, de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante (SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France y Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain; respectivamente).

### **2. L. DETERMINACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS ESPLACNICOS.**

La determinación de las concentraciones tisulares de citoquinas se realizó mediante una técnica de inmunoensayo enzimático de tipo *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, utilizando kits comerciales específicos para rata (BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España).

#### **2.L.1.Homogeneización de los tejidos.**

Las muestras de tejido congelado se introdujeron en tubos de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, Estados Unidos) que contenían tampón de lisis a 4 °C (10 ml de tampón/g de tejido). El tampón de lisis contiene fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), pepstatina A 1 µ g/ml (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceptina en tampón fosfato a pH 7,2 con el 0,05% de azida sódica. Las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 30 s con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, Estados Unidos) a máxima velocidad. A continuación, las muestras son "sonicadas" 5 veces, y se congela el sobrenadante a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Tras su descongelación a 4° C se centrifugaron a 3.000 rpm y se midió el volumen final de

homogeneizado con una pipeta graduada. Los homogeneizados tisulares se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la determinación cuantitativa de las citoquinas.

### **2.L.2. Valoración de Proteína quimiotáctica de macrófagos, TNF-alfa, IL-10 e IL-13.**

La cuantificación de los niveles tisulares de TNF $\alpha$ , IL-10, IL-13, y *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP-1), se realizó mediante un método *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay* (ELISA), utilizando kits específicos para rata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

### **2.L. 3. Determinación de los niveles tisulares de proteínas.**

Para valorar las concentraciones de proteínas en las muestras tisulares se utilizó un método químico espectrofotométrico. Se prepara una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en PBS. Posteriormente, se añaden a las cubetas de lectura del espectrofotómetro 2, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu\text{l}$  de dicha solución, y se completan hasta un volumen final de 800  $\mu\text{l}$  de PBS (es decir, añadiremos 798, 796, 792, 788, 784 y 780  $\mu\text{l}$  de PBS). Añadimos a todas las cubetas 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford (BIO-RAD Protein Assay) y dejamos actuar 5 minutos. Posteriormente, se procede a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia) a 595 nm., calibrándolo en blanco sin proteína, que contiene 800  $\mu\text{l}$  de PBS y 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford, y se realiza la curva patrón.

Para calcular la cantidad de proteína de las muestras del complejo linfático mesentérico superior (CLMS) y del íleon fue necesario hacer una dilución 1/10 en PBS, porque al estar muy concentradas, quedaban fuera de la curva patrón. Se extrapoló el valor de la absorbancia obtenida de la muestra problema sobre la curva patrón, y así se obtuvo la concentración de proteínas. Todas las muestras se valoraron como

mínimo dos veces, y posteriormente se realizó la media aritmética de los valores obtenidos.

La cantidad de proteínas presente en las muestras se cuantificó mediante el método Bradford, que está basado en los cambios de color que sufre el reactivo Bradford (Azul de Coomassie) cuando se une a residuos de proteínas, concretamente a aminoácidos básicos (principalmente arginina) y a aminoácidos aromáticos.

## **2. M. ESTUDIO DEL RECuento DE CELULAS CEBADAS MUCOSAS Y CONECTIVAS ESPLACNICAS.**

### **2.M.1.Células cebadas mucosas.**

La inmunodetección del RMCP-II o quimasa, que es un marcador específico de células cebadas mucosas en la rata, se ha realizado en tejidos esplácnicos, utilizando un kit comercial basado en la técnica de ELISA (MS-RM4.1:500; centro de salud animal Moredun Edimburgo, RU). Las muestras de tejidos esplácnicos congeladas, se pasaron a tubos de 50ml de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park; NJ) que contenían tampón de lisis estéril a 4 °C, a razón de 250 microlitros de tampón por cada 0.5 g de tejido. El tampón de lisis utilizado fue tampón fosfato salino (PBS) con 0.05% de Tween 20.

Se homogeneizaron las muestras durante 30s con un homogeneizador eléctrico (Polyton; Brinkmann instruments, Westminster, NY) a máxima velocidad. Una vez homogeneizadas, las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

Para su determinación, fueron homogeneizadas de nuevo 3 veces, y posteriormente, sonicadas 5 veces a 5 g. Se retiró el sobrenadante, almacenándolo a -80°C hasta la realización del ELISA para la determinación cuantitativa de la concentración de RMCP-II, usando un Kit comercial (Huntley y cols, 1990).



Para optimizar el preceso, se diluyó el anticuerpo monoclonal contra RMCP-II de ratón. Las muestras se diluyeron con PBS estéril hasta 1ml, y se centrifugaron a 15.000 rpm y a 4°C. La concentración resultante fue de 0.2 microgramos/ml en un tampón carbonato 0.1 M a pH 9.6.

Previo a su uso, se incubaron las placas a 4°C con el anticuerpo durante 21 - 24 horas. Justo antes de pipetear las muestras, se incubó de nuevo la placa a 37°C con albúmina sérica bovina (sigma) durante 30 minutos, para evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente se pipetearon las muestras y se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos. Tras este período se añadieron un anticuerpo anti RMCP-II de oveja y el conjugado (horseadish peroxidase conjugate (sigma), y se incubó nuevamente a 37°C durante una hora.

La placa se reveló utilizando O-fenilenediamina como sustrato, leyéndose a 450nm, tras parar la reacción con una solución de ácido sulfúrico 0.25M.

La concentración de RMCP-II se cuantificó por extrapolación de los valores obtenidos sobre la curva patrón de RMCP-II. Por otro lado, se midió la concentración de proteína en los tejidos por la técnica de Bradford (2.1.3), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La concentración final de RMCP-II se expresó como microgramos de RMCP-II por mg de proteína.

### **2.M.2.Celulas cebadas de tejido conectivo.**

La técnica de tincion de azul de toluidina (ph 2.0-2.5) se utilizó para la detección de las celulas cebadas de tejido conectivo.Las celulas cebadas fueron identificados por tinción metacromatica de sus granulos (Galli y cols 1990).El número total de celulas cebadas de tejido conectivo por seccion tisular fue determinado en tres a cinco secciones por tejido y animal.Todo el recuento fue realizado con una tecnica de doble ciego para evitar el sesgo de observador(Serna y cols 2006)

### 2.N. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática SPSS versión:19.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2010): En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de los resultados obtenidos, expresándolos mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ( $\bar{x} \pm DE$ ). A continuación se realizó un test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra (procedimiento NPAR TESTS) para determinar si las variables cuantitativas del estudio provienen de una distribución normal (Ferrán, 1996).

Para la comparación de las variables cualitativas entre los diferentes grupos de animales se utilizó la prueba de la Chi-cuadrado, en tanto que para comparar las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Análisis de la varianza (ANOVA) (procedimiento ONEWAY), para la comparación de múltiples medias. Cuando el valor global de la F de Snedecor es significativo nos indica que las medias en los grupos no son iguales. En éste último caso, cuando existía un contraste estadísticamente significativo se empleó el test de Duncan para contrastes a posteriori. Este test realiza comparaciones múltiples de medias, ordenándolas de menor a mayor y comparando las diferencias entre pares (menor-mayor), así como conectando los grupos que no difieren significativamente. De esta manera se identifican subconjuntos de medias no significativamente diferentes. Si dos medias se agrupan en un mismo subconjunto, no son diferentes significativamente, en el caso contrario se consideran diferentes significativamente. (Ferrán, 1996) (Sánchez, 1996). Por último, se ha realizado un Análisis de la varianza, ANOVA de 2 factores (procedimiento UNIANOVA), para la comparación de múltiples medias sobre dos condiciones y a continuación el test de Duncan para las comparaciones múltiples de medias de cada factor (Ferrán, 1996).

Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

## ***IV. RESULTADOS***

### 1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS:

#### 1.A. Supervivencia:

De todos los animales que formaron parte del diseño experimental (n=80) sobrevivieron 65 a las ocho-nueve semanas del postoperatorio, correspondiendo 28 de ellos a ratas pseudo-operadas (SO) y 37 a ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ).

La mortalidad de los animales con colestasis ( n=15) se ha atribuido a complicaciones postoperatorias inmediatas secundarias a la puesta a punto de la técnica quirúrgica (n=7) y a hemorragia gastrointestinal secundaria a insuficiencia hepática crónica y sepsis en los animales con supervivencia a largo plazo. (n=8)

#### 1.B. Complicaciones postoperatorias

Las ratas pseudo-operadas no presentaron complicaciones durante la evolución postoperatoria (p.o.). Por el contrario, las ratas con CMQ sufrieron las siguientes alteraciones:

##### - **Pared abdominal:**

La cicatriz de la laparotomía mostraba evidentes alteraciones tróficas e incluso algunas ratas desarrollaron *eventraciones*. En 5 ratas con colestasis no tratadas (CMQ) (25%) se evidenció la presencia de eventración mientras que no se demostró en ninguna de las tratadas con Ketotifén. Siete ratas con CMQ (35%) presentaron adelgazamiento y *alteraciones tróficas de la piel* de la laparotomía, en tanto que las ratas colestásicas tratadas con Ketotifén no presentaron estas alteraciones. Por último, tres ratas con colestasis (15%) presentaron *ulceras y abscesos* en la piel mientras que en ninguna de las tratadas con Ketotifen aparecieron estas lesiones.

##### - **Complicaciones neurológicas:**

A las 8-9 semanas del p.o. los animales colestásicos se muestran menos reactivos, disminuyendo su movilidad. Además, las ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática presentan movimientos más lentos respecto a las ratas pseudooperadas y menor respuesta a los estímulos dolorosos.

### - **Colestasis:**

Los animales con CMQ presentaban ictericia cutánea, más evidente en las orejas, las extremidades y la cola, así como coluria y acolia.

## **2. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN LA NECROPSIA**

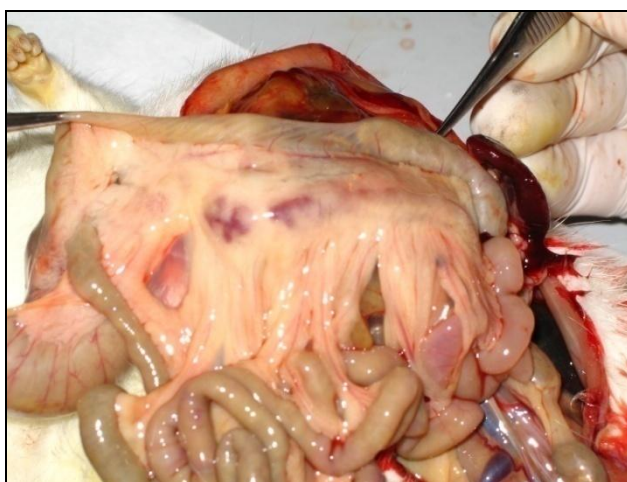
En las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) existe una heterogeneidad de la *afectación hepática*. Algunos animales presentan gran fibrosis hepática con aumento de la consistencia del órgano y hepatomegalia franca, asociado a la presencia de un gran volumen de *ascitis* (ocasionalmente hemorrágica), presencia de circulación colateral porto-sistémica, *adenitis mesentérica* hemorrágica e intensa ictericia muco-cutánea. En las ratas con colestasis tratadas con Ketotifén (CMQ+K) la mayoría de los animales presentaban ascitis escasa o ausente. El hígado en la mayor parte de los casos era congestivo y de color amarillento, pero no pétreo ni de aspecto fibrótico, aunque ocasionalmente se observaba algún foco de necrosis (Figura 15). Un pequeño porcentaje de ratas desarrollaron pequeños quistes biliares a nivel hilar y parenquimatoso (35% en ratas con CMQ y 27,7% en ratas con CMQ+K). Es menos frecuente la observación de pequeños *abscesos* intrahepáticos y de *focos de necrosis* hepática en ambos grupos. En ocasiones se aprecian *adherencias* epiplóicas al hígado con circulación colateral porto-hepática.



**Figura 15:** Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una rata pseudooperada (izquierda) y otra con colestasis microquirúrgica (derecha).

## RESULTADOS

Algunas ratas desarrollaron *úlceras gástricas*, más frecuentemente en las ratas colestásicas no tratadas. Las paredes del estómago y del intestino delgado mostraban ocasionalmente un aspecto edematoso y engrosado. Uniformemente en ambos grupos (CMQ y CMQ+K) se observaba *edema retroperitoneal y pancreático*. Todas las ratas con colestasis presentaban *adenitis mesentérica*(Figura 16), bien congestiva y menos frecuentemente hemorrágica, un 40% en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y un 22,2% en las ratas tratadas con Ketotifén (CMQ+K) .



**Figura.16:** Presencia de adenopatías mesentericas hemorrágicas en una rata con colestasis extrahepatica microquirurgica(CMQ).

En ambos grupos de animales con colestasis(CMQ y CMQ+K) existía una disminución marcada de la grasa del mesenterio.

A nivel torácico se ha comprobado la existencia de *infartos pulmonares* y *derrame pleuro-pericárdico* ocasionalmente.

Los testículos de las ratas con colestasis de ambos grupos estaban disminuidos de tamaño y atróficos, edematosos y con tinte icterico en comparación con los de las ratas pseudoperadas. Los riñones, sin embargo, presentan mayor tamaño en las ratas con colestasis microquirúrgica comparándolo con las pseudoperadas y desarrollan un color verde oscuro(Figura 17).

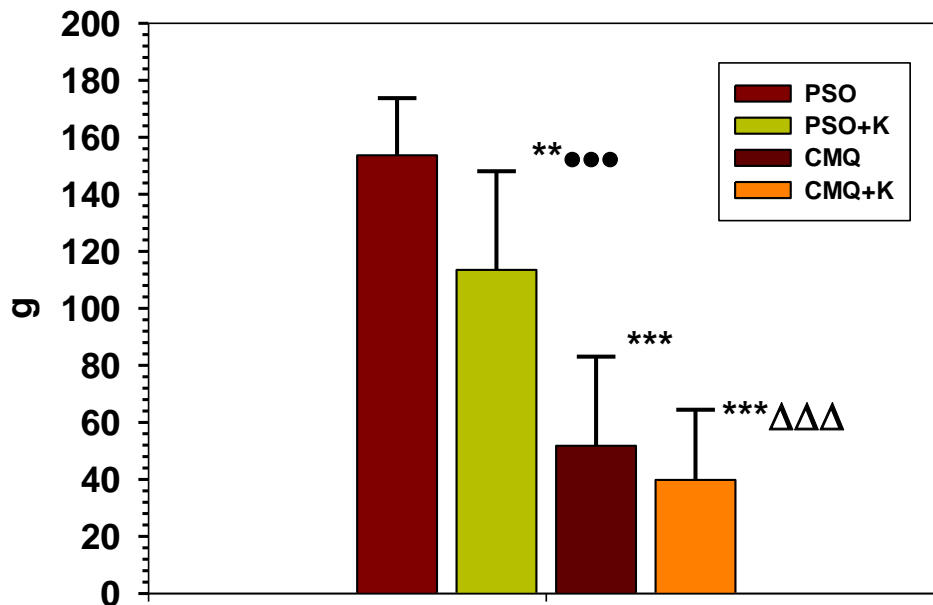


**Figura 17:** Imagen de los órganos extraídos en una rata con colestasis microquirúrgica (CMQ) sacrificada a las 8 semanas de la intervención. Bazo, lóbulos superiores e inferiores hepáticos, riñones y testículos.

### 3. EVOLUCION DEL PESO CORPORAL

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento del peso corporal durante el periodo postoperatorio, se representan en la Figura 18. El incremento del peso corporal al final del período evolutivo de 8-9 semanas es menor ( $p < 0.001$ ) en el grupo de ratas con colestasis (CMQ) y en las ratas colestásicas tratadas con Ketotifen (CMQ+K) respecto al grupo de pseudooperadas (SO). La administración de Ketotifen a los animales SO cursa con menor ( $p < 0.01$ ) aumento de peso al final del período p.o., sin embargo en las ratas con colestasis éste efecto no se ha producido. (Figura 18).

## Δ Peso Corporal



**Figura 18:** El incremento del peso corporal ( $\Delta$  Peso; g) en ratas pseudo-operadas (PSO), pseudoperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K), con colestasis microquirúrgica (CMQ) y con colestasis tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media  $\pm$  DE: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ●●● $p < 0.001$ : valor ES respecto de CMQ;  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

## 4. PESO HEPÁTICO

Todos los animales con colestasis presentaban hepatomegalia, si bien el aumento del peso hepático (PH) es mayor ( $p < 0.001$ ) en las ratas no tratadas (CMQ) que en aquellas a las que se administró Ketotifen ( $p < 0.01$ ) (CMQ+K). De hecho, la diferencia del PH entre éstos dos grupos de ratas fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (Tabla 2). Por el contrario, la administración de Ketotifen a los animales PSO no ejerció ningún efecto sobre el PH (Tabla 2). Cuando analizamos la relación PH/PC los resultados son similares, aunque la administración de Ketotifen no reduce el incremento del PH ( $p < 0.001$ ) en las ratas colestásicas (Tabla 2; Figura 19).



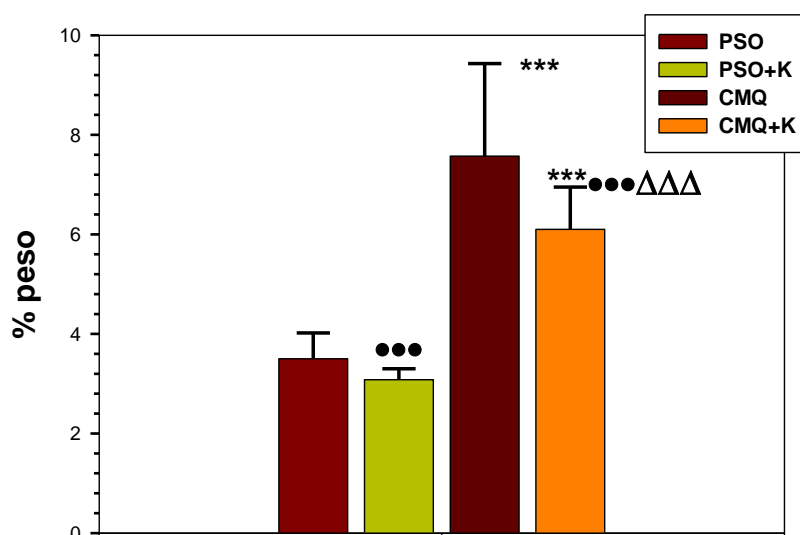
## RESULTADOS

Grupo	PH(g)	(PH/PC)x100
SO(n=15)	13,82±2,27	3,50±0,52
CMQ(n=16)	26,015±5,22***	7,57±1,86***
SO+K(n=13)	12,13±0,87***	3,08±0,22***
CMQ+K(n=17)	17,90±3,88***●●●ΔΔΔ	6,10±0,85***●●●ΔΔΔ

**Tabla**

2: **Peso hepático (PH) e índice PH/Peso corporal final (PH/PCx100) de las ratas pseudoperadas, (SO) con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudoperadas tratadas con Ketotifén (SO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001: valor ES respecto a SO; ●●●p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K.**

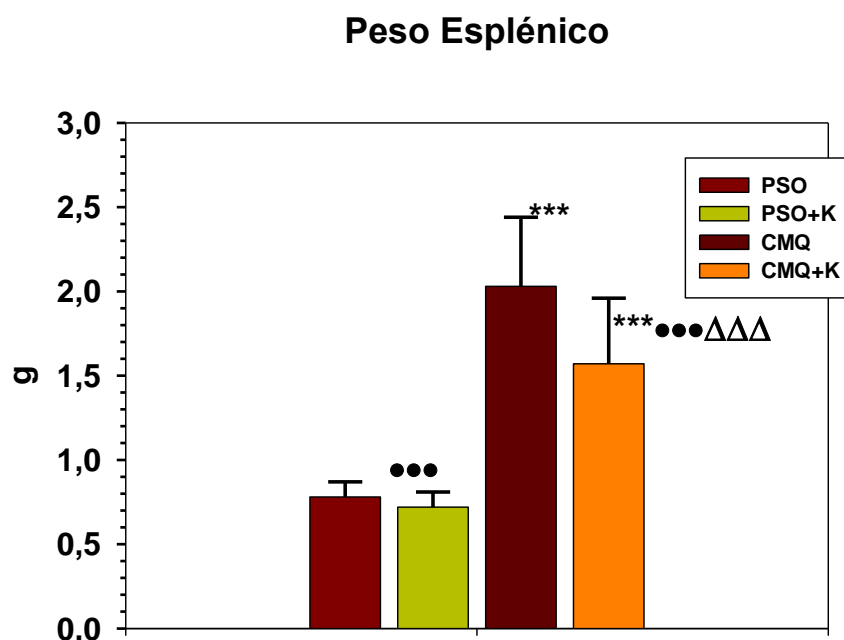
### Peso Relativo Hepático (PH/PC)



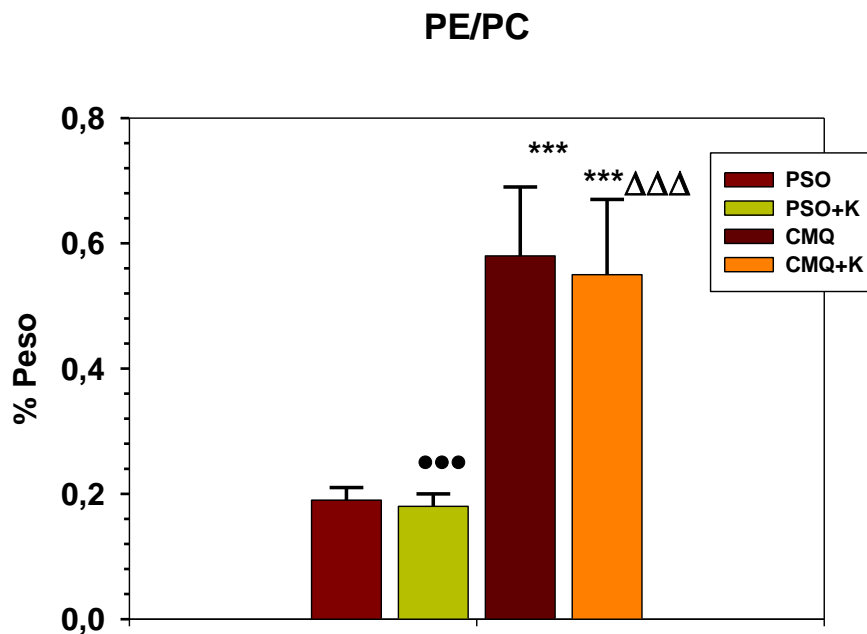
**Figura 19:** **Peso hepático (PH) e índice PH/Peso corporal final (PH/PCx100) de las ratas pseudoperadas, (PSO) con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudoperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media ± DE; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001: valor ES respecto a PSO; ●●●p<0.001; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔp<0.001; valor ES respecto de PSO+K.**

## 5. PESO ESPLÉNICO

Todos los animales con colestasis, tanto los tratados como los no tratados con Ketotifen, mostraron esplenomegalia, siéndolo el aumento del peso esplénico (PE) significativo ( $p < 0.001$ ) respecto de las ratas pseudooperadas (Figura 20). La administración de Ketotifen reduce ( $p < 0.001$ ) la esplenomegalia en las ratas con colestasis, en tanto que no cambia el PE en las ratas pseudooperadas (Figura 20). Sin embargo, cuando el peso esplénico se considera respecto del peso corporal, las diferencias en el peso entre las colestasis tratadas y las no tratadas no son significativas. (Figuras 20 y 21).



**Figura 20 :** PE en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$ ; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$ ; valor ES respecto de PSO+K;



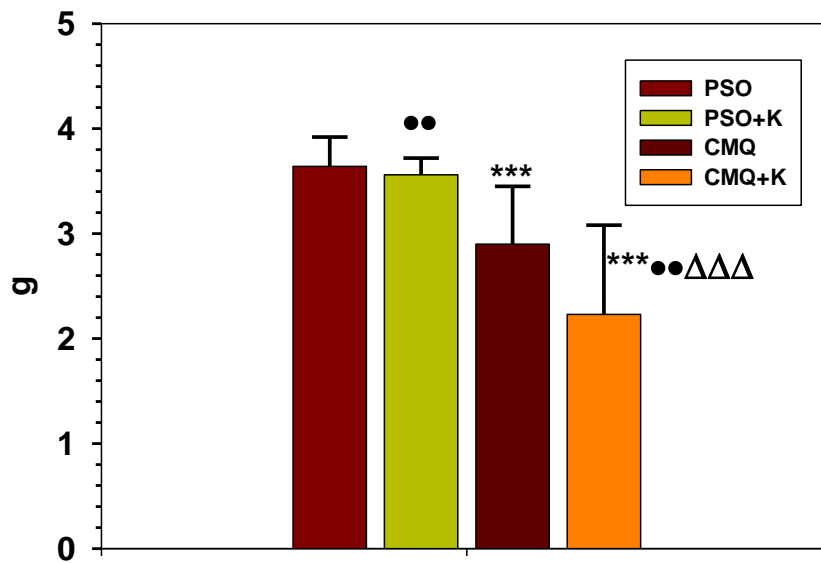
**Figura 21 :** Relación entre el PE y el peso corporal total (PC) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$ : valor ES respecto de CMQ;  $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

## 6. PESO TESTICULAR

En las ratas con colestasis, tratadas y no tratadas con Ketotifen, se observaba atrofia testicular, siéndolo el peso testicular inferior en éstos animales ( $p < 0.001$ ) respecto de los animales pseudoperados (Figura 22). La administración del fármaco no varió el peso testicular en las ratas pseudo-operadas, en tanto que en las ratas con colestasis se produce un descenso ( $p < 0.01$ ) de dicho peso (Figura 22). Cuando el peso testicular se considera respecto del peso corporal, la atrofia testicular es significativa ( $p < 0,01$ ) en las ratas con colestasis tratadas con ketotifén respecto a las pseudoperadas ( Figuras 22 y 23 ).

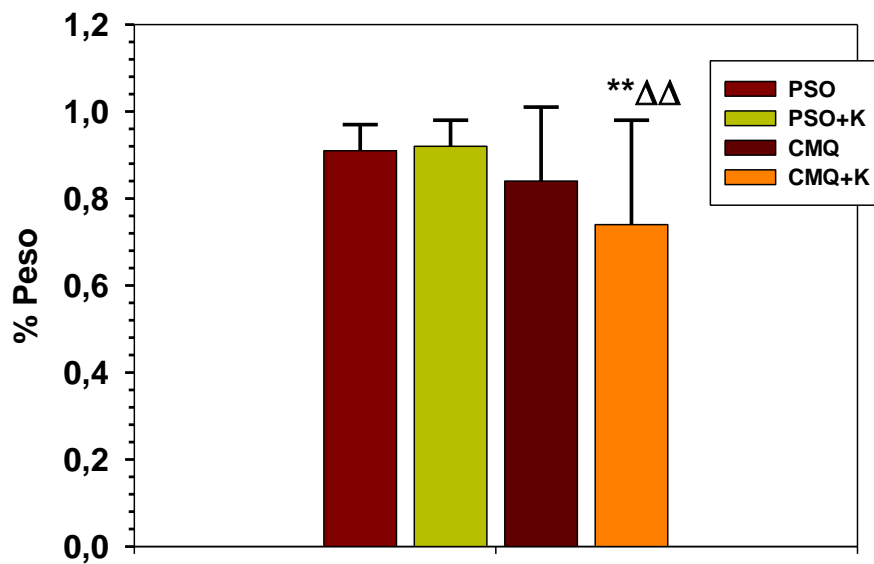
## RESULTADOS

### Peso Testicular



**Figura. 22 :** Peso testicular respecto en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; •• $p < 0,01$ : valor ES respecto a CMQ; ΔΔ $p < 0.01$ : valor ES respecto de PSO+K.

### PT/PC

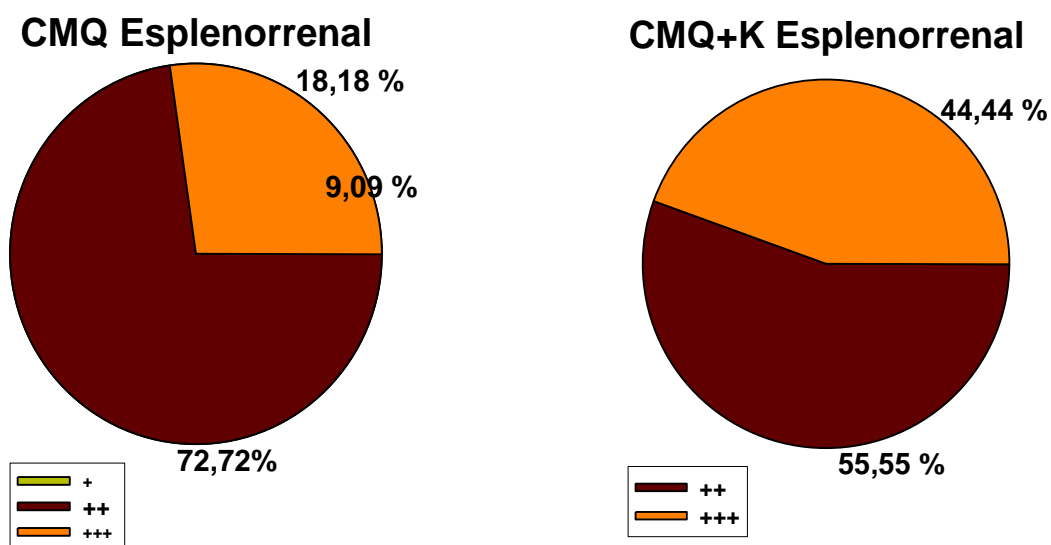


**Figura 23:** Relación del peso testicular respecto al peso corporal total (PT/PC)x100% en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\* $p < 0.0$ : valor ES respecto a PSO; ΔΔ $p < 0.01$ : valor ES respecto de PSO+K.

### 7. CIRCULACION COLATERAL ESPLENORRENAL

La mayor parte de los animales a los que se induce colestasis microquirúrgica (CMQ) desarrollan circulación colateral porto-sistémica.

El *efecto pro-angiogénico* de Ketotifen cuando se administra a ratas con colestasis parece confirmarse también respecto de la circulación colateral porto-sistémica de tipo *esplenorrenal* (ER), ya que aunque todas las ratas con CMQ presentaron éste tipo de vasos colaterales, su desarrollo fue mayor cuando se administró el fármaco (Figura 24).



**Figura 24:** Circulación Colateral Postosistemica Esplenorrenal en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)

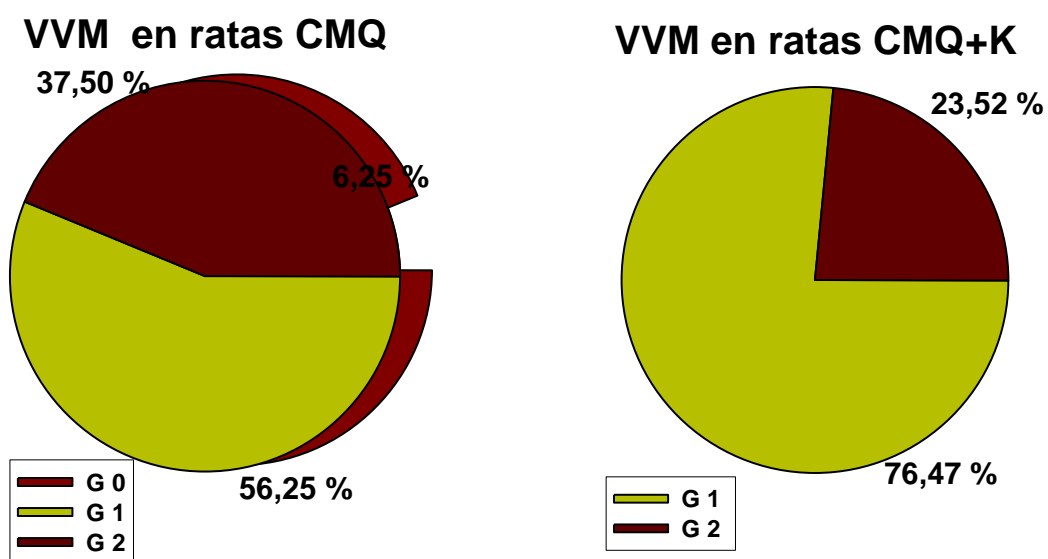
### 8. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA

Prácticamente todos los animales con colestasis presentaron vasculopatía venosa mesentérica, si bien en los que fueron tratados con Ketotifen, el desarrollo de éste tipo de vasculopatía fue mayor, en particular el grado 2, caracterizado por un aspecto de gran dilatación y tortuosidad de los vasos mesentéricos (Tabla 3, Figuras 25 y 26),

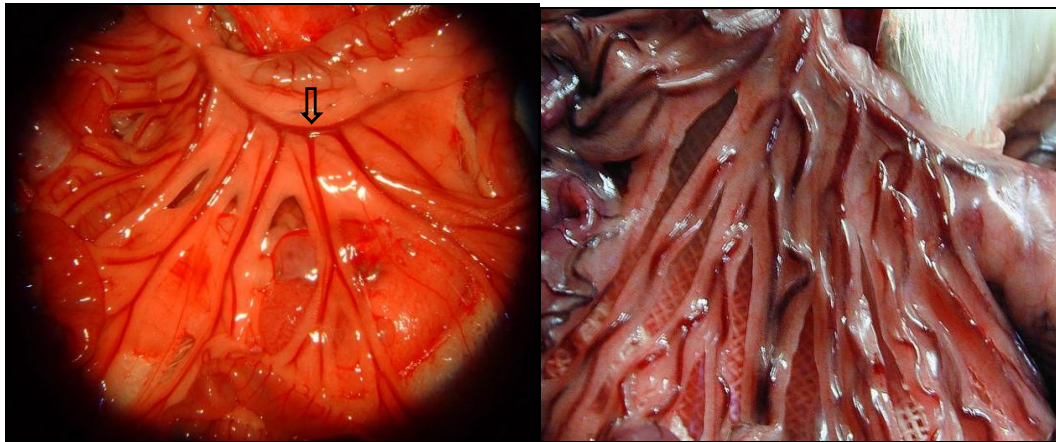
## RESULTADOS

GRUPO	G-0	G-1	G-2
<b>CMQ</b> (n=16)	1 (6,25%)	6 (37,5%)	9 (56,25%)
<b>CMQ+K</b> (n=17)	0	4 (23,52%)	13 (76,47%)

**Tabla 3:** Desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica (VVM) en diferentes grados (0,1 y 2) en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K)



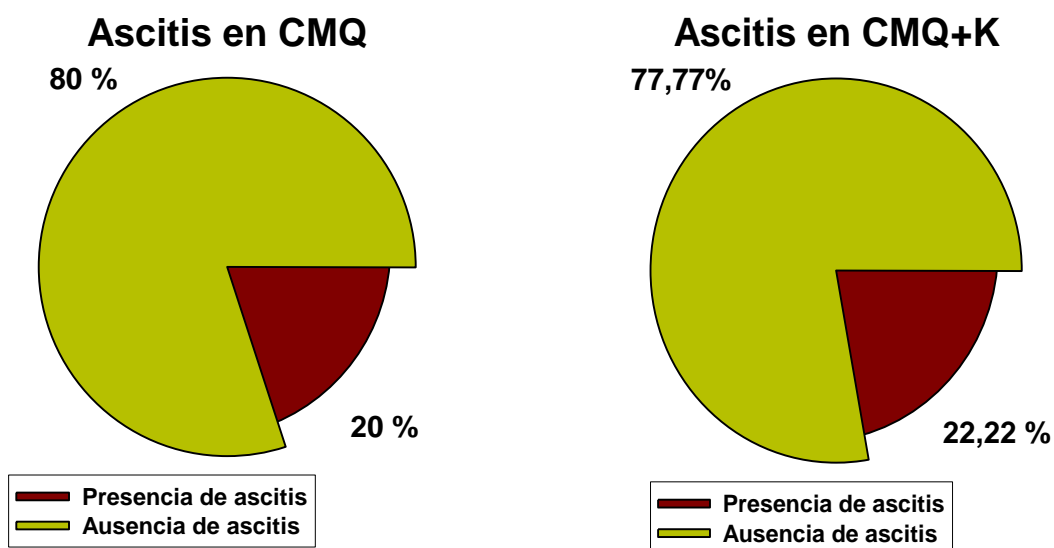
**Figura 25** Grados de vasculopatía venosa mesentérica en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K)



**Figura 26** Vasculopatía Venosa Mesentérica: A la izquierda Rata pseudo-operada en la que se observan la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas. A la derecha Rata con CMQ en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje de la vena mesentérica superior

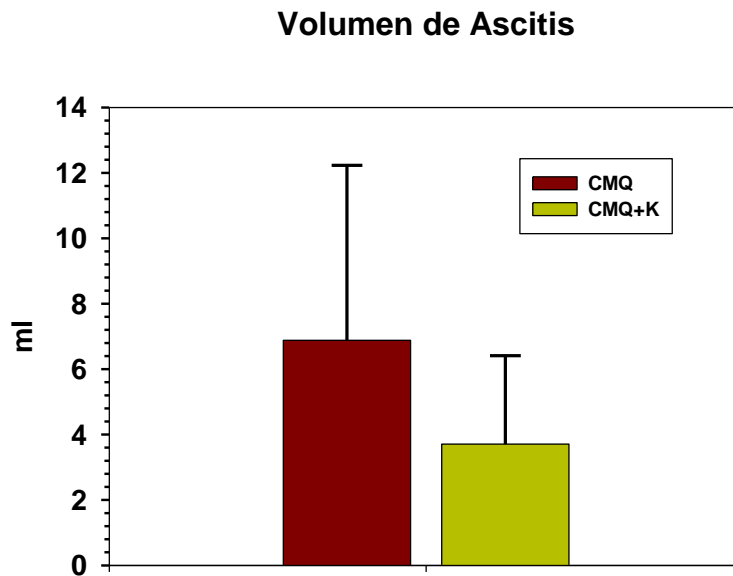
### 9. ASCITIS

La mayor parte de los animales con colestasis microquirúrgica presentaban ascitis al final del período post-operatorio de 8-9 semanas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las ratas con colestasis sin tratar respecto a las que sí fueron tratadas con ketotifén. (Figura 27).



**Figura 27:** Presencia de Ascitis en ratas con colestasis microquirúrgica(CMQ) y colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén(CMQ+K)

Respecto del volumen de líquido ascítico, aunque la administración de Ketotifen parece reducirlo cuando es administrado a ratas con colestasis, tras la comparación estadística mediante la t de Student para la igualdad de medias la diferencia no es estadísticamente significativa ( Figura 28)



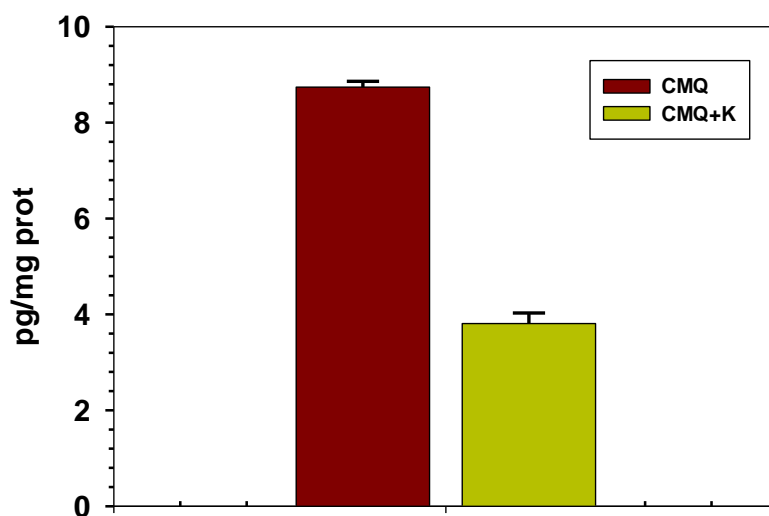
**Figura 28 :** Volumen de ascitis en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con Ketotifén desde 24horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K) Media  $\pm$  DE.

Las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K) presentan niveles de IL-13 disminuidos ( $p < 0,01$ ) respecto a las no tratadas (CMQ). Las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén (CMQ+K) presentan niveles de CGRP disminuidos ( $p < 0,001$ ) respecto a las no tratadas (CMQ). (Figuras 29 y 30).



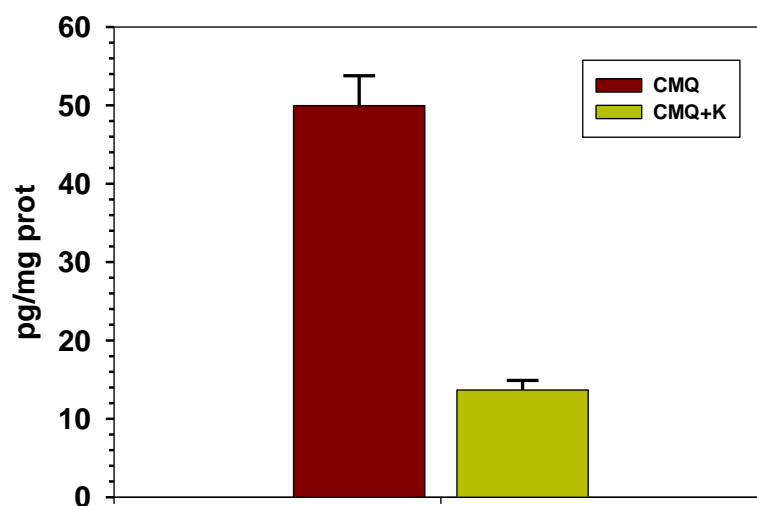
## RESULTADOS

### IL-13



**Figura 29:** Concentraciones de IL-13 en el líquido ascítico en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con Ketotifén desde 24horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K); Media  $\pm$  DE.

### CGRP

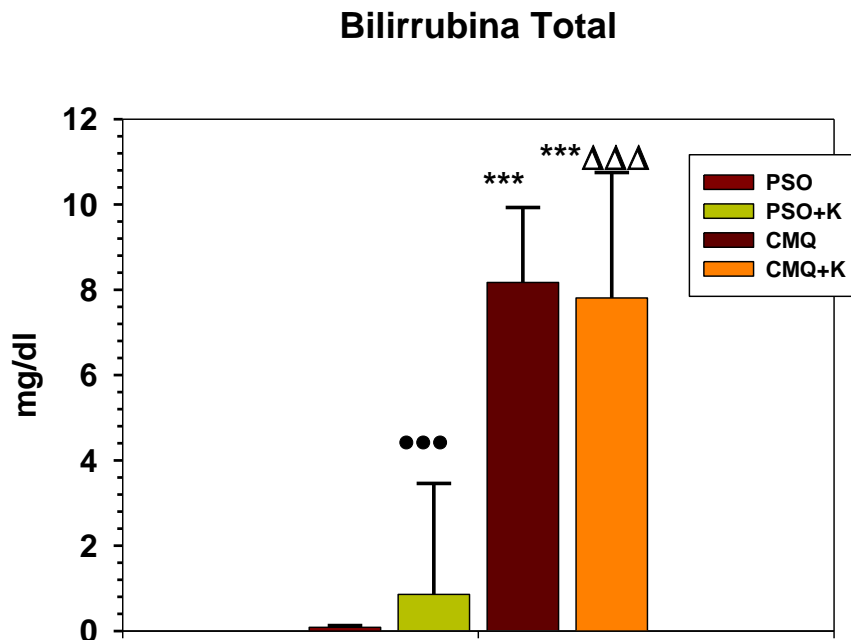


**Figura 30:** Concentraciones de CGRP en el líquido ascítico en las ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ) y en las ratas con colestasis tratadas con Ketotifén desde 24horas. antes de la intervención y durante todo el periodo p.o. (CMQ+K); Media  $\pm$  DE.

## 10.BIOQUIMICA SANGUINEA:

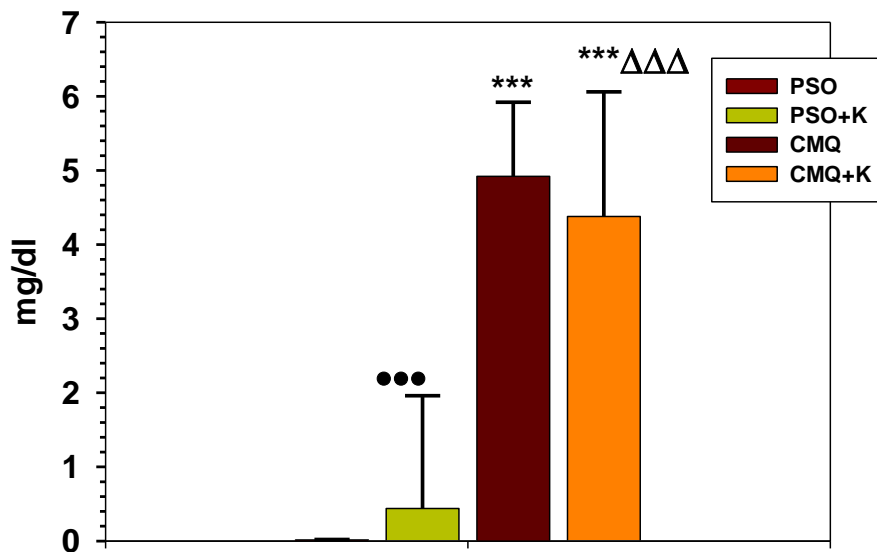
### -Bilirrubina total y directa

Las concentraciones séricas de parámetros marcadores de lesión biliar muestran una evolución similar. Así, los niveles de bilirrubina total y bilirrubina directa aumentan ( $p<0.001$ ), en todos los animales colestásicos respecto de los seudo-operados, independientemente de la administración de Ketotifen. Sin embargo el tratamiento con Ketotifen reduce dicho incremento ( $p<0.001$ ) (Figuras 31 y 32)



**Figura 31 :** Concentración sérica de Bilirrubina Total (BT;mg/dl), en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ +K) Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p<0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p<0.001$ : valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p<0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

## Bilirrubina Directa



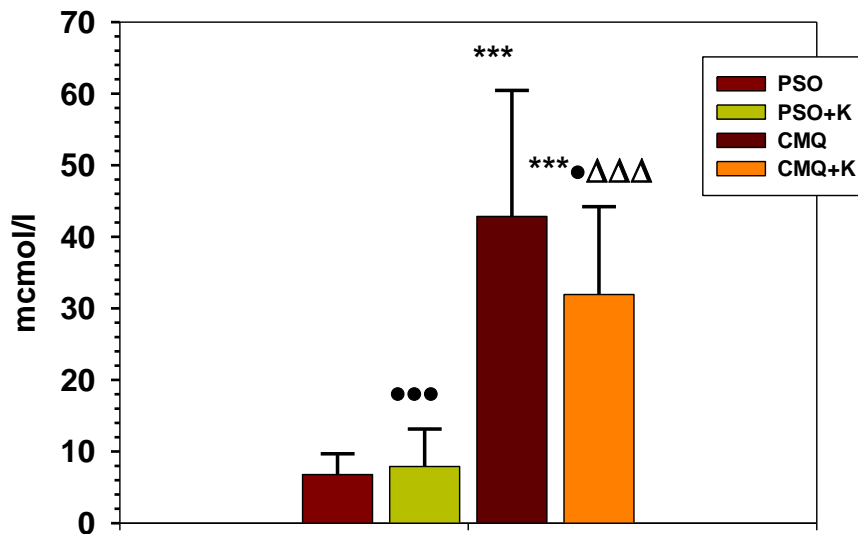
**Figura 32** : Concentración sérica de Bilirrubina directa(BD;mg/dl) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ +K) Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$ ; valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

### -Ácidos biliares

Las concentraciones séricas de ácidos biliares aumentan ( $p < 0.001$ ), en todos los animales colestásicos respecto de los seudo-operados, independientemente de la administración de Ketotifen (Figura 33). La administración de ketotifen causa una disminución estadísticamente significativa de sus concentraciones en los animales colestasicos(Figura 33)

## RESULTADOS

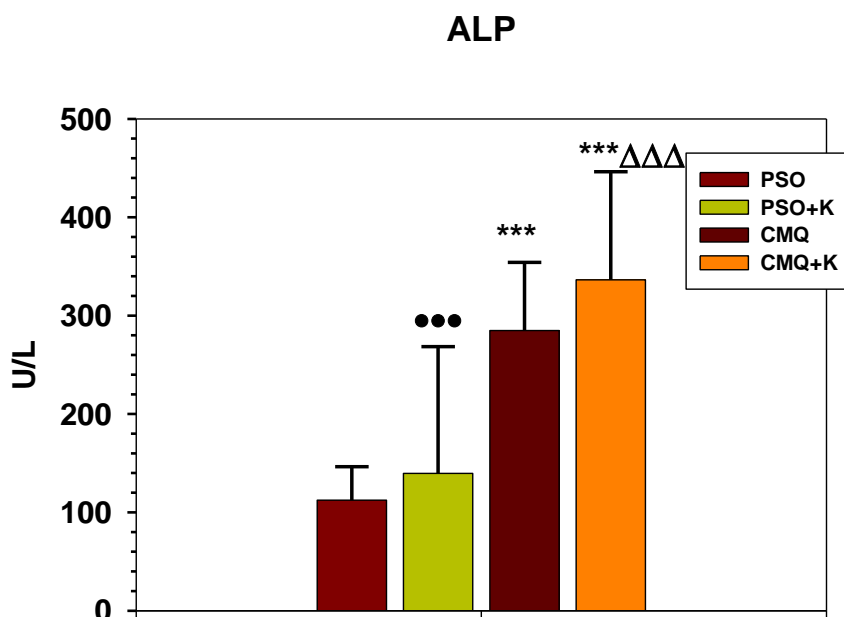
### Ácidos Biliares



**Figura 33 :** Concentración sérica de Ácidos Biliares ( $\mu\text{mol/L}$ ) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K) Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$ ; ••• $p < 0.001$ : valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

### -Fosfatasa alcalina

Las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina aumentan ( $p < 0.001$ ), en todos los animales colestásicos respecto de los seudo-operados, independientemente de la administración de Ketotifen (Figura 34).

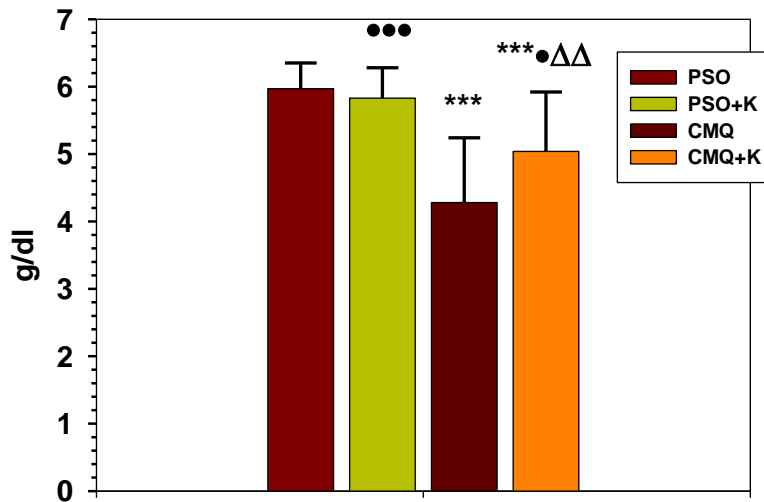


**Figura 34 :** Concentración sérica de Fosfatasa Alcalina (ALP) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ+K) Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$ : valor ES respecto de CMQ; ΔΔΔ $p < 0.001$ : valor ES respecto de PSO+K.

## -Proteínas totales

Las concentraciones séricas de proteínas totales descienden ( $p < 0.001$ ) en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados. Sin embargo, cuando se administraba Ketotifen la hipoproteinemía era inferior ( $p < 0.05$ ) ( Figura 35).

## Proteínas Totales



**Figura 35** : Concentración sérica de proteínas totales (g/dl) en ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén (CMQ +K) Media  $\pm$  DE; \*\*\* $p < 0.001$ ; valor ES respecto a PSO; • $p < 0.05$ ; ••• $p < 0.001$ ; valor ES respecto de CMQ;  $\Delta\Delta p < 0.01$ ; valor ES respecto de PSO+K.

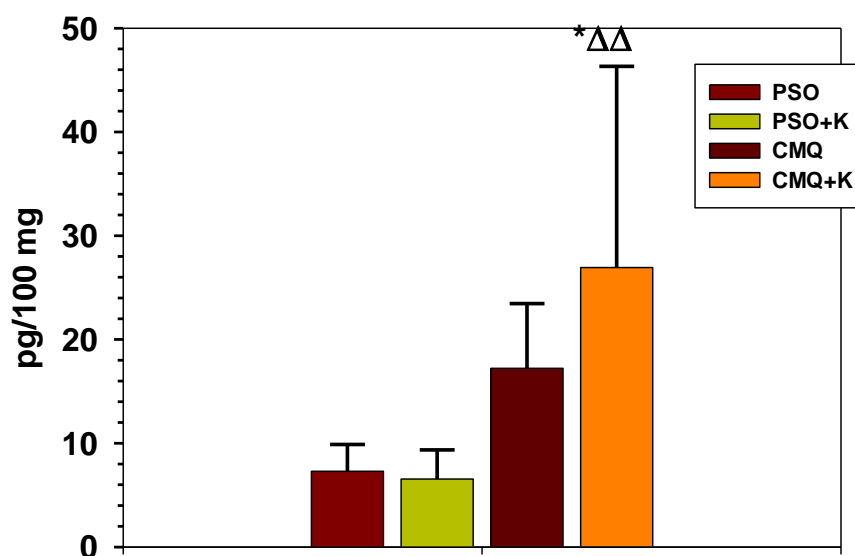
## 11. ESTUDIO DE MEDIADORES INFLAMATORIOS ESPLÁCNICOS

### • MCP-1:

Las concentraciones de Proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) aumentaron ( $p < 0.001$ ) en el íleon y en el hígado en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados (Figuras 36 y 37). En los ganglios linfáticos mesentéricos estas concentraciones disminuyen en las ratas colestásicas (Figura 38). La administración de Ketotifen disminuyó los niveles de ésta citoquina en el hígado de las ratas con colestasis (Figura 37).

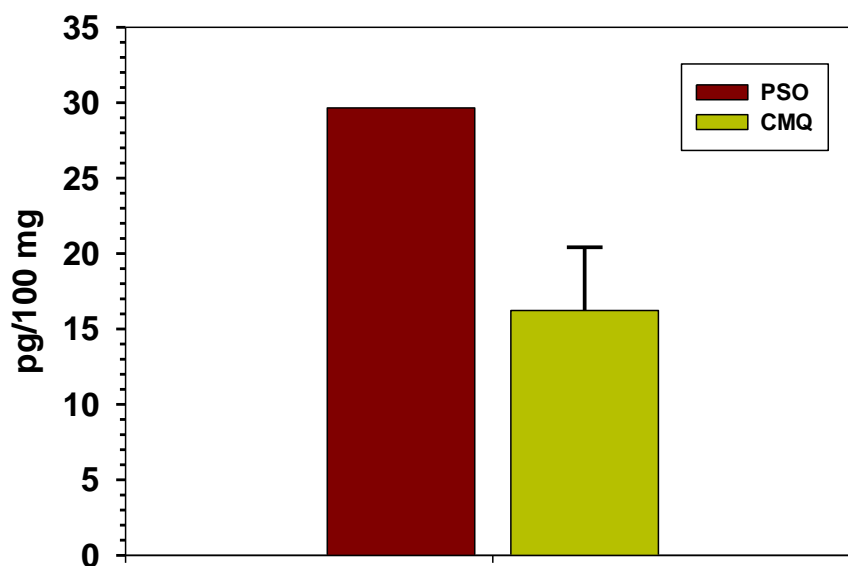
## RESULTADOS

### MCP 1 en ileon



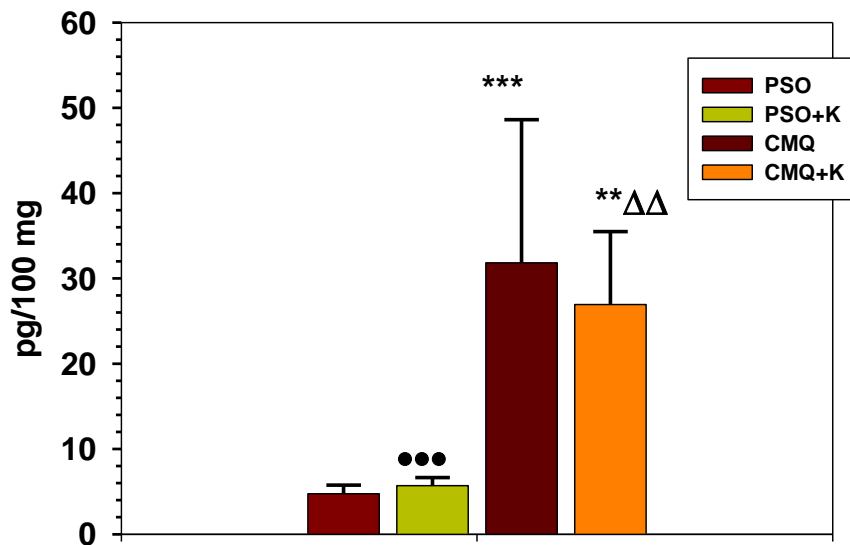
**Figura 36.:** Concentraciones de Proteína quimioatrayente de macrofagos 1 (MCP-1) en el íleon terminal de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \* $p < 0.05$ : valor ES respecto a PSO;  $\Delta\Delta p < 0.01$ : valor ES respecto de PSO+K..

### MCP 1 en GLM



**Figura 37 :** Concentraciones de MCP-1 en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudooperadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica.(CMQ). Media  $\pm$  DE.

### MCP 1 en Hígado



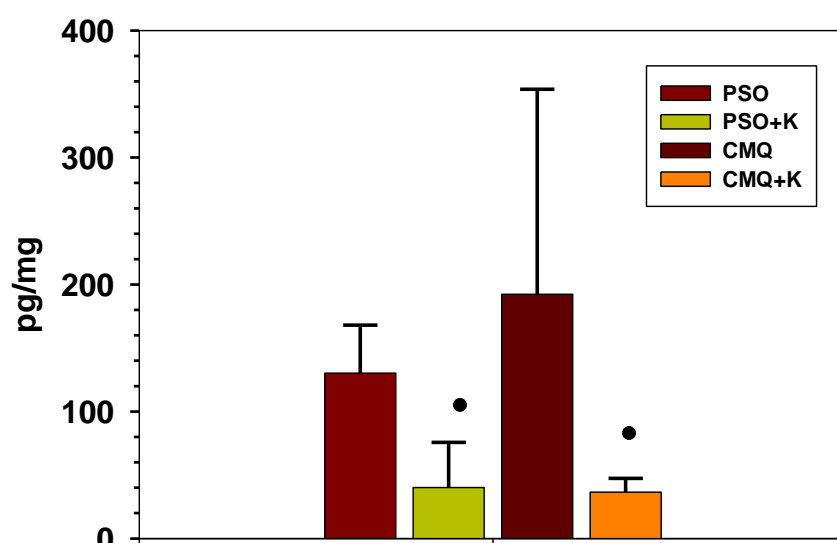
**Figura 38 :** Concentraciones de Proteína quimioatrayente de macrofagos 1 (MCP-1) en el hígado, de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ : valor ES respecto a PSO; ••• $p < 0.001$ ; valor ES respecto de CMQ; ΔΔ $p < 0.01$ : valor ES respecto de PSO+K

#### • TNF- $\alpha$ :

Los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  aumentaron en el ileon en las ratas con colestasis respecto de las pseudo-operadas (Figura 39). El tratamiento con Ketotifen disminuyó los niveles de ésta citoquina en el ileon y en el hígado, tanto en las ratas pseudo-operadas como en las colestásicas ( $p < 0.05$ ) (Figuras 39, 40, 41).

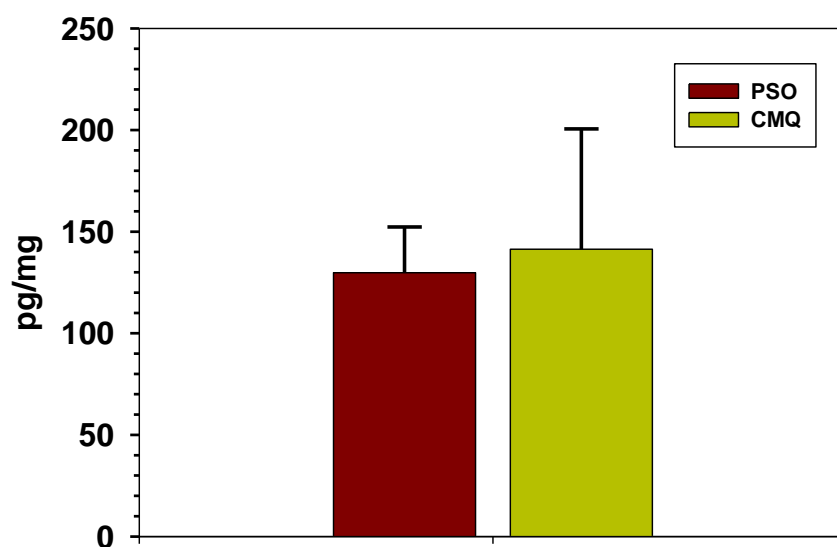


## TNF $\alpha$ en Ileon



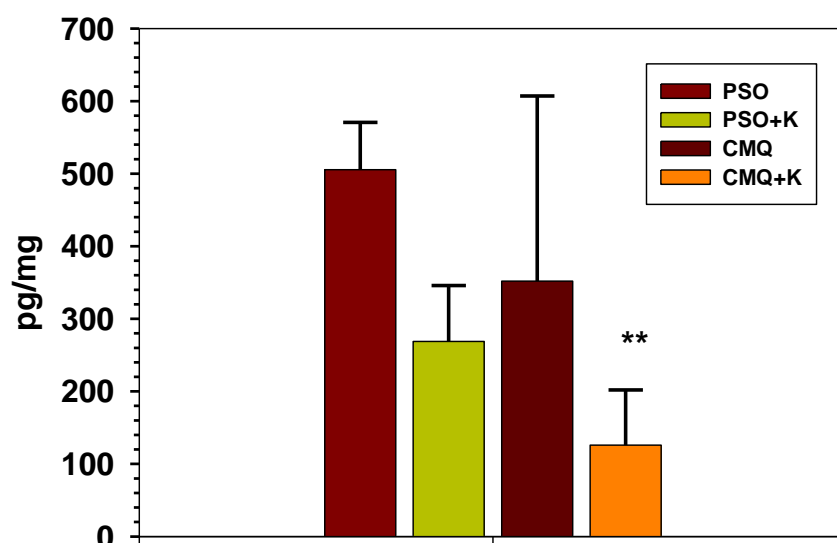
**Figura 39 :** Concentraciones de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en el ileon terminal de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; •  $p < 0.05$ : valor ES respecto de CMQ

## TNF $\alpha$ en GLM



**Figura 40 :** Concentraciones de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudooperadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ).

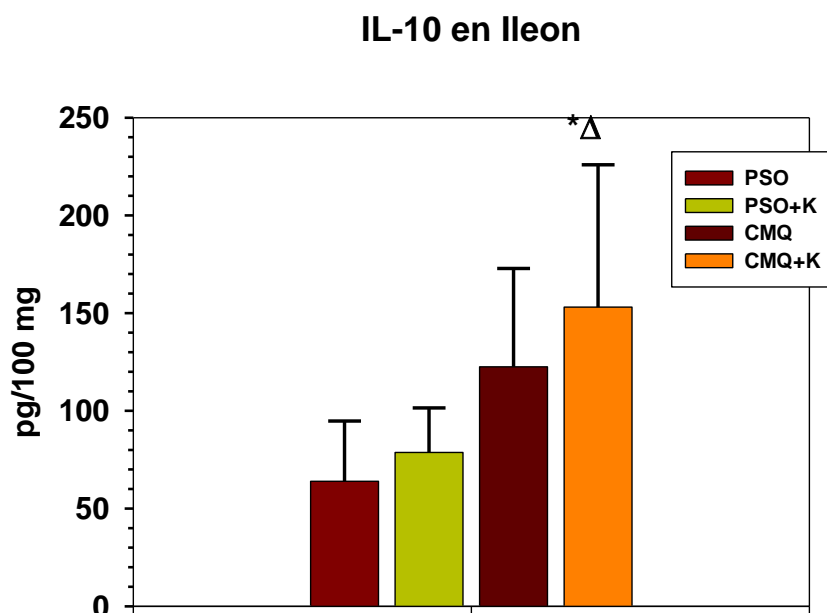
### TNF $\alpha$ en Hígado



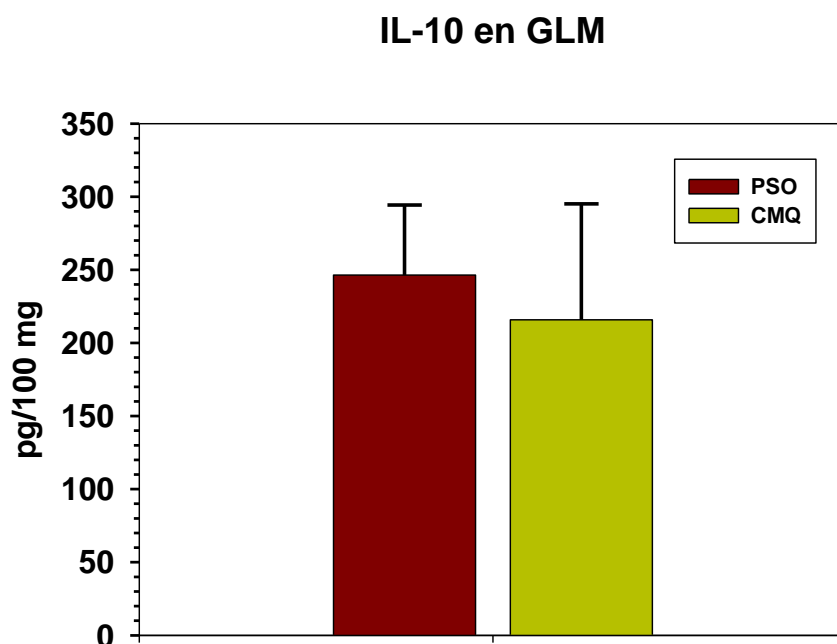
**Figura 41 :** Concentraciones de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en el hígado de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \*\* $p < 0.01$ : valor ES respecto a PSO.

#### • IL-10:

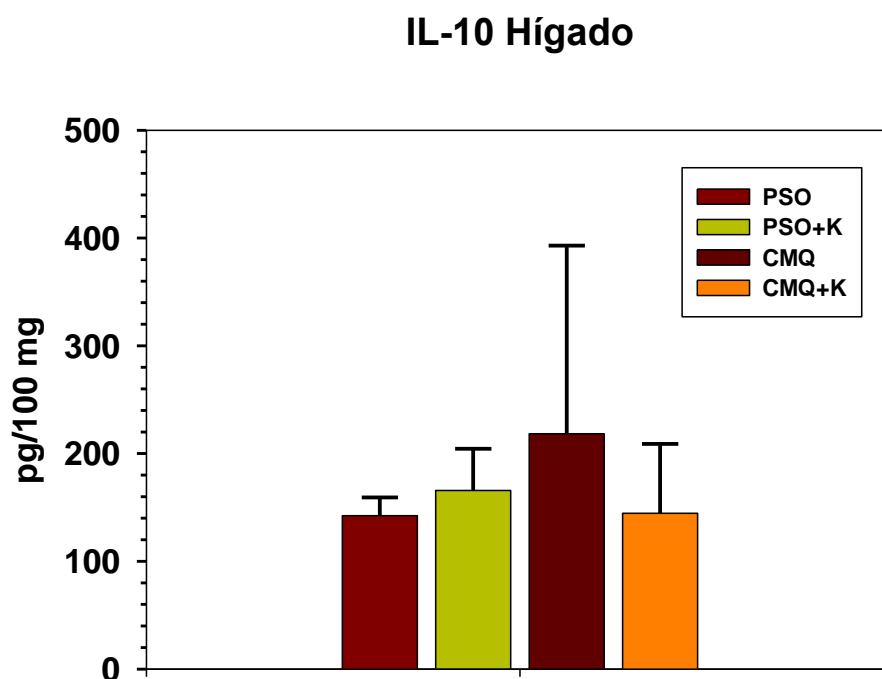
En las ratas colestásicas IL-10 aumentó en el ileon y en el hígado respecto de los animales pseudo-operados. La administración de Ketotifen a las ratas con colestasis aumentó ( $p < 0,05$ ) los niveles de ésta citoquina en el ileon, pero los disminuyó en el hígado. (Figuras 42, 43, 44).



**Figura 42 :** Concentraciones de Interleuquina-10 (IL-10) en el íleon terminal de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; \* $p < 0.0$ : valor ES respecto a PSO;  $\Delta p < 0.05$ : valor ES respecto de PSO+K.



**Figura 43:** Concentraciones de Interleuquina-4 (IL-4) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudooperadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ) . Media  $\pm$  DE.

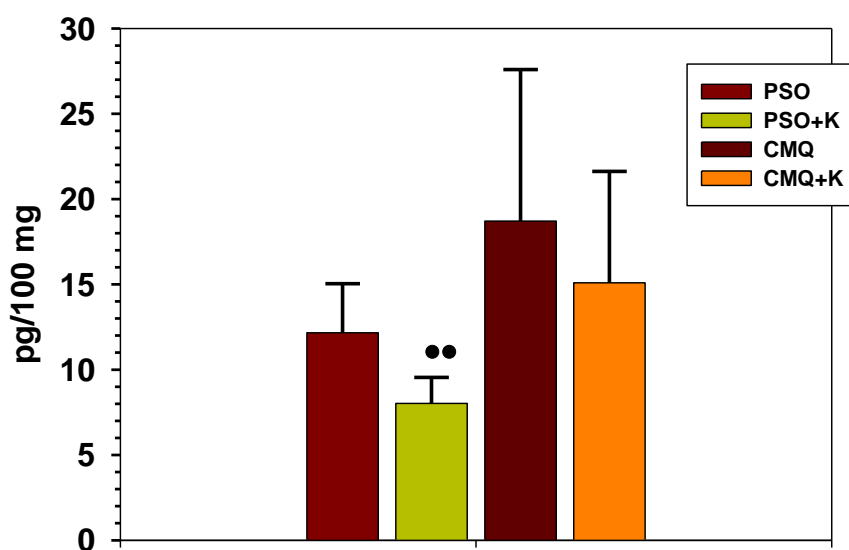


**Figura 44 :** Concentraciones de Interleuquina-10 (IL-10) en el hígado de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE.

- **IL-13:**

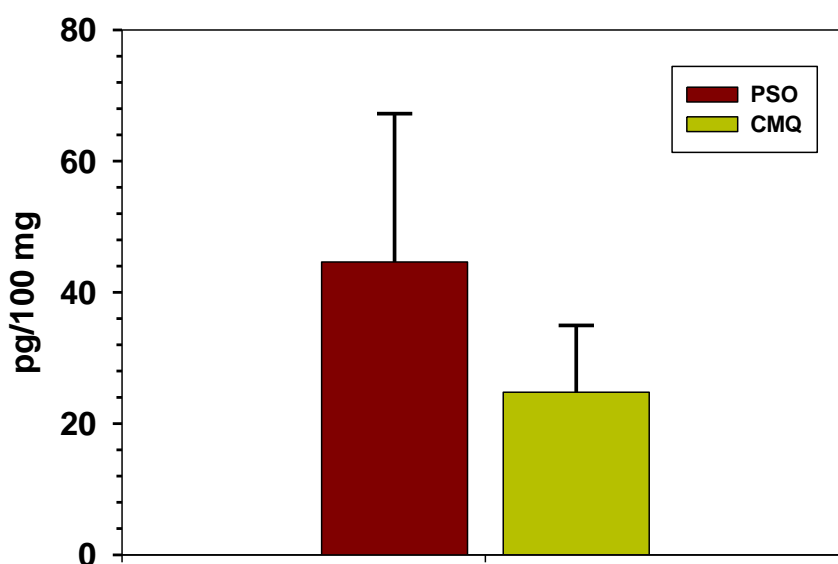
En las ratas colestásicas IL-13 aumentó en el ileon y disminuyó en los ganglios linfáticos mesentéricos respecto de los animales pseudo-operados (Figuras 45, 46, 47). La administración de Ketotifen a las ratas con colestasis disminuyó los niveles de IL-13 en el ileon y en el hígado de las ratas colestasicas.

## IL-13 Ileon

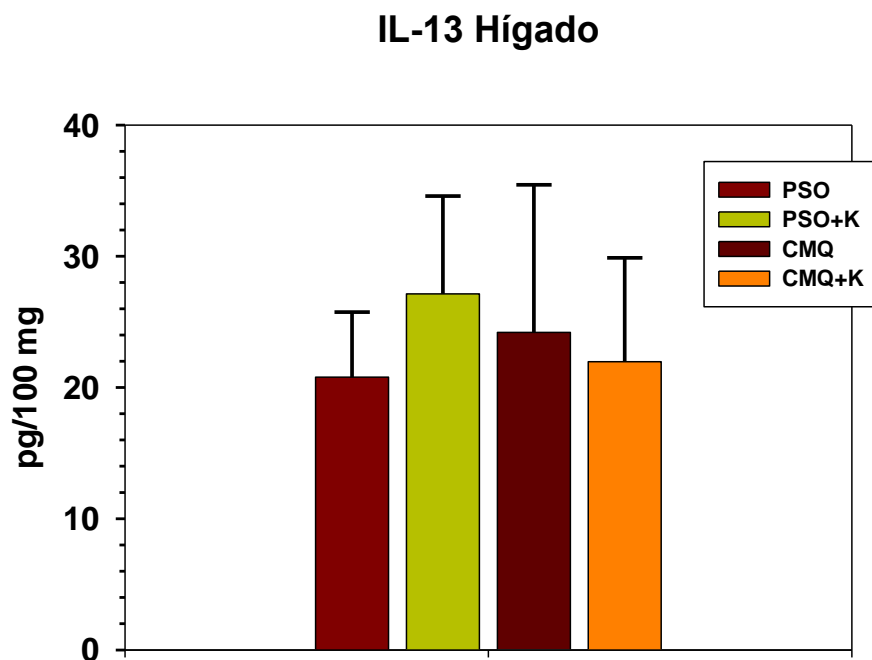


**Figura 45 :** Concentraciones de Interleuquina-13 (IL-13) en el ileon terminal de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE; •• $p < 0.01$ : valor ES respecto de CMQ.

## IL-13 GLM



**Figura 46 :** Concentraciones de Interleuquina-13 (IL-13) en los ganglios linfáticos mesentéricos en ratas pseudooperadas, (PSO) y con colestasis microquirúrgica (CMQ). Media  $\pm$  DE.



**Figura 47 :** Concentraciones de Interleuquina-13 (IL-13) en el hígado de ratas pseudooperadas, (PSO), con colestasis microquirúrgica (CMQ), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (PSO+K) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMQ+K). Media  $\pm$  DE.

## 12. ESTUDIO DEL RECUENTO DE CÉLULAS CEBADAS MUCOSAS Y CONECTIVAS ESPLÁCNICAS

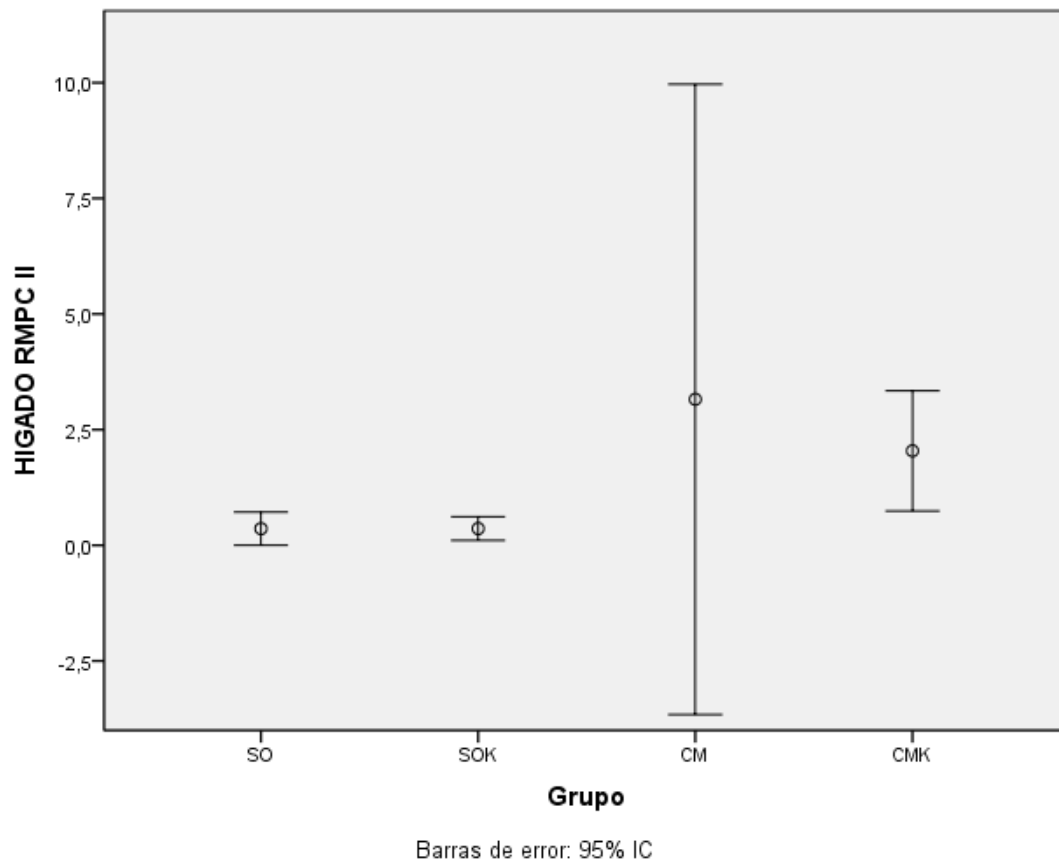
Las dos subpoblaciones de células cebadas que han sido determinadas en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon, son las denominadas células cebadas mucosas (RMCP II) y células cebadas de tejido conectivo (RMCP I) (RMCP: rat mast cell protease).

### -Hígado

La densidad de células cebadas mucosas (RMCP-II) en hígados de ratas con colestasis microquirúrgica presenta un incremento estadísticamente significativo respecto a la correspondiente a los animales seudooperados (Figura 48). A su vez, los animales tratados con Ketotifen presentan diferencias significativas entre seudooperados y colestásicos. Así, en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, el tratamiento con Ketotifen, la densidad de células cebadas mucosas presenta una reducción estadísticamente significativa respecto a las ratas colestásicas (Figura 48).

## RESULTADOS

por último, el tratamiento con Ketotifen tanto a ratas con pseudointervención como con colestasis extrahepática, no modifica la densidad de células cebadas mucosas en el parénquima hepático, respecto a los animales seudooperados y colestásicos no tratados (Figura 48 ).

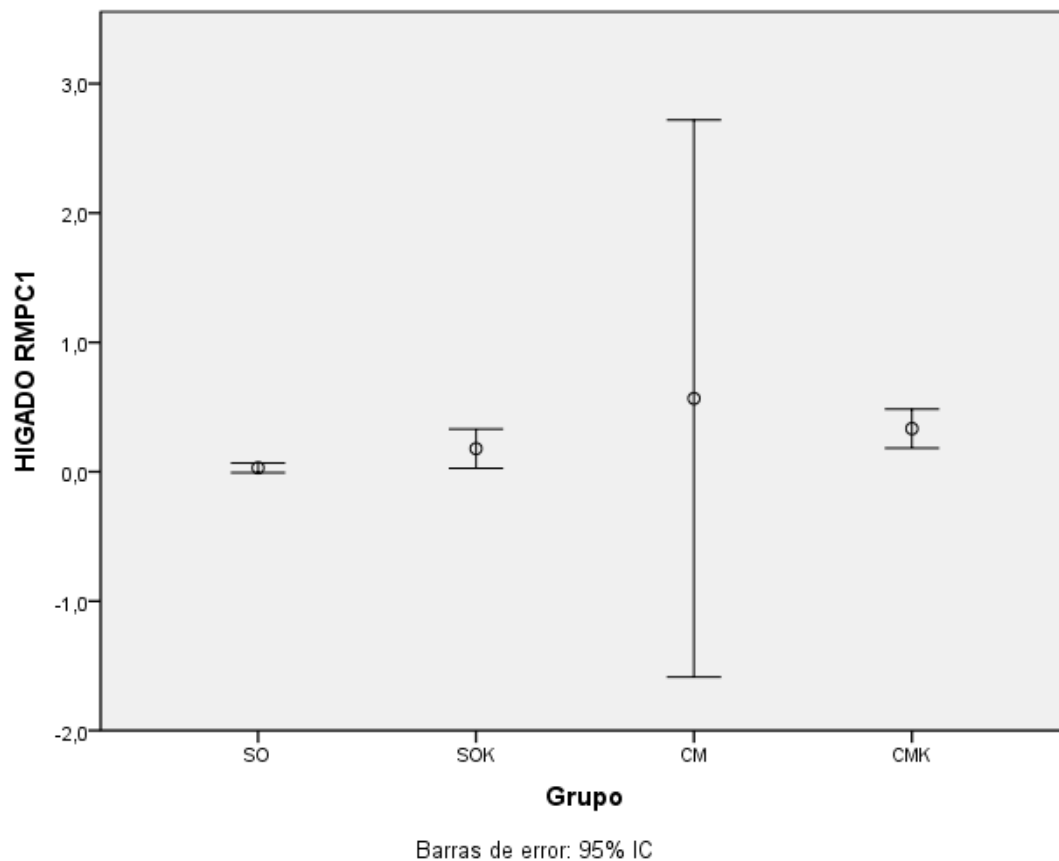


**Figura 48** -Concentraciones de RMCP- II en el hígado de ratas seudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), seudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.

Las células cebadas de tejido conectivo ( RMCP-I) en el hígado de ratas con colestasis, sufren un incremento estadísticamente significativo respecto a los animales seudooperados (Figura 49). Sin embargo, el tratamiento con ketotifen de ambos grupos de animales no consigue producir diferencias estadísticamente significativas respecto de los animales colestásicos no tratados.

## RESULTADOS

Se podría considerar por lo tanto que Ketotifen no evita el incremento de células cebadas, tanto mucosas como conectivas, en el hígado de ratas colestásicas (Figura 49).



**Figura 49** -Concentraciones de RMCP- I en el hígado de ratas seudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), seudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.

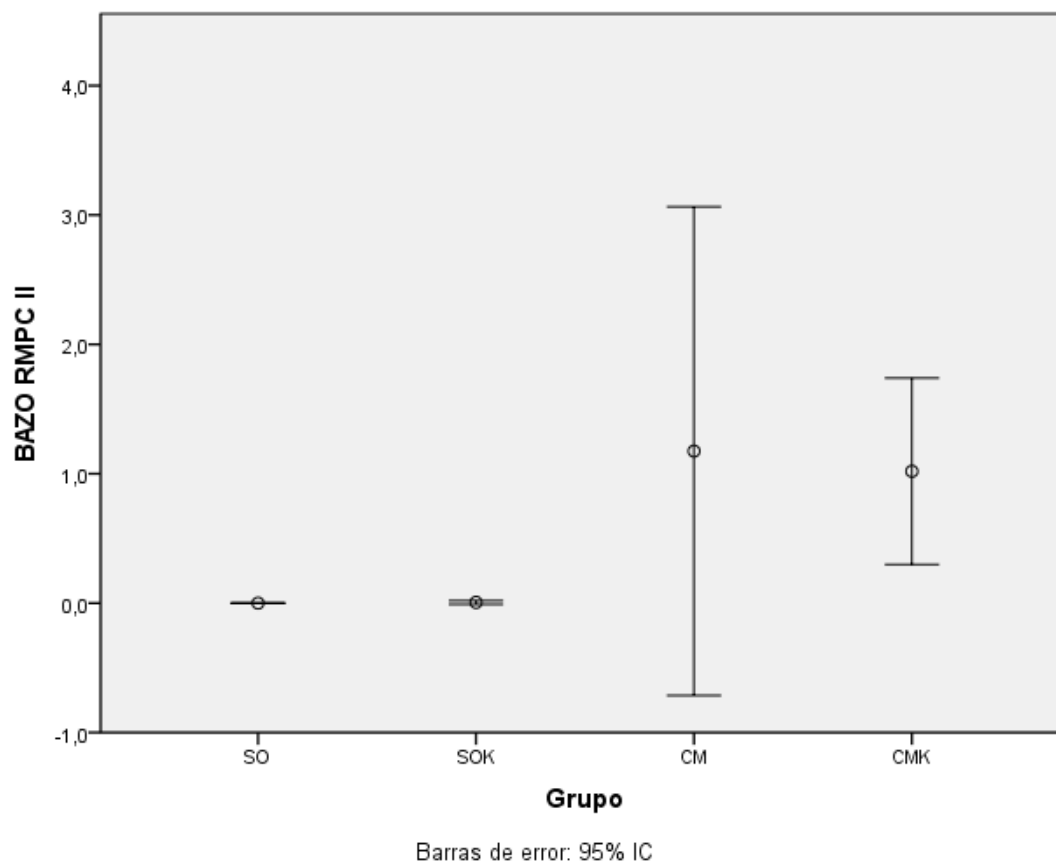
### -Bazo

Las ratas con colestasis extrahepática presentan un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la densidad de células cebadas tanto mucosas como de tejido conectivo en el parénquima esplénico (Figuras 50 y 51). Sin embargo, al ser tratadas con Ketotifen, se produce una disminución de la densidad de células cebadas de tejido conectivo, en tanto que la densidad de células cebadas mucosas no presenta variaciones significativas. A su vez, los animales con pseudointervención, tratados con Ketotifen, no presentan alteraciones significativas del

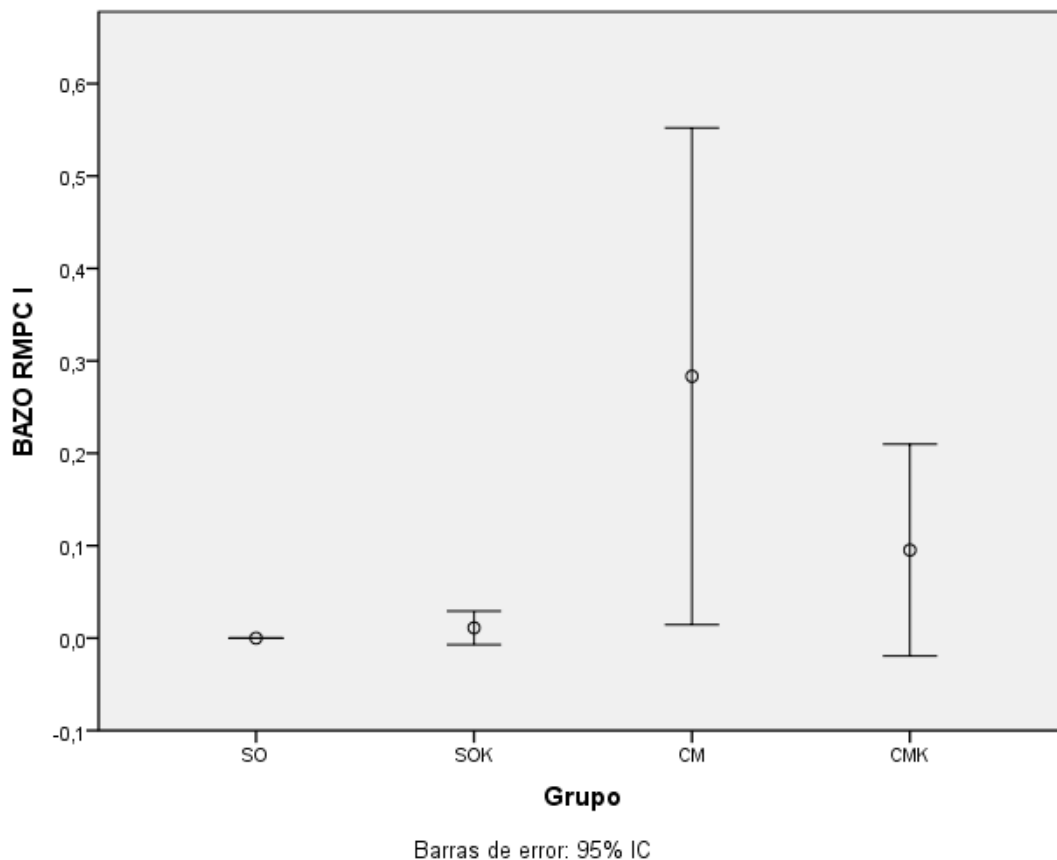


## RESULTADOS

número de células cebadas, tanto mucosas como conectivas, respecto de los animales con pseudointervención no tratados (Figuras 50 y 51).



**Figura 50** -Concentraciones de RMCP- II en el bazo de ratas pseudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.



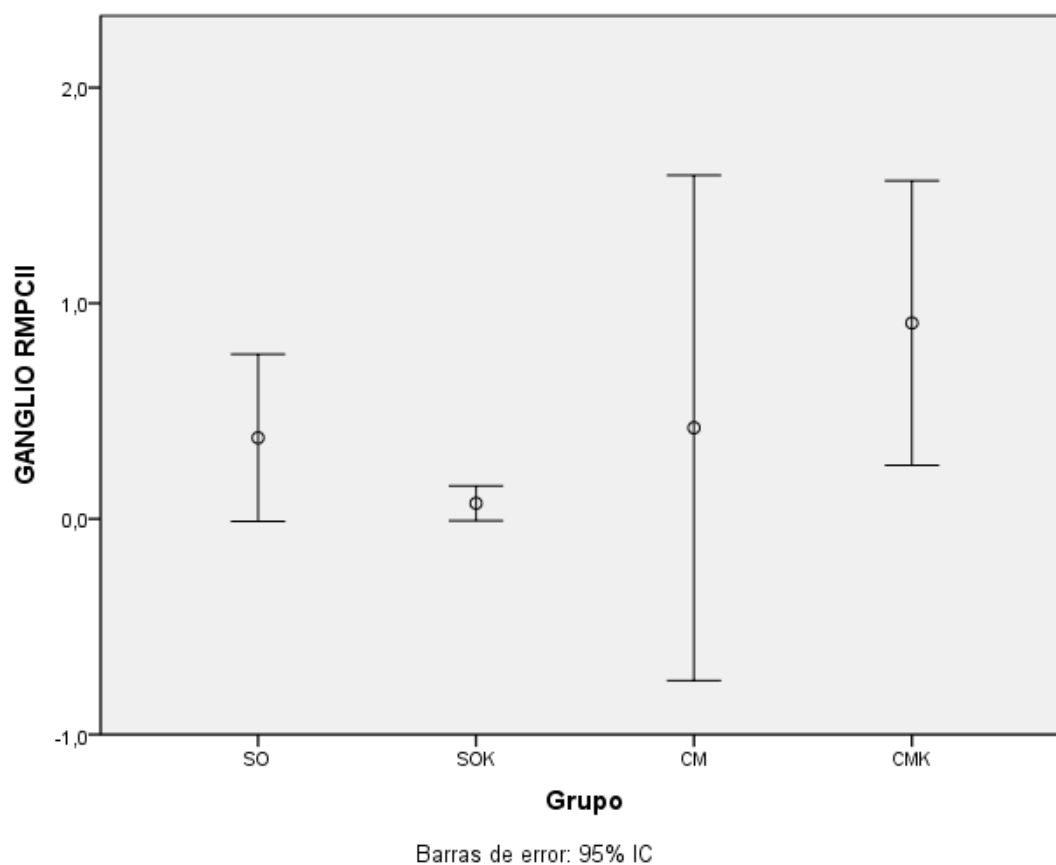
**Figura 51** -Concentraciones de RMCP- I en el bazo de ratas seudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), seudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.

### -Ganglios linfáticos mesentéricos

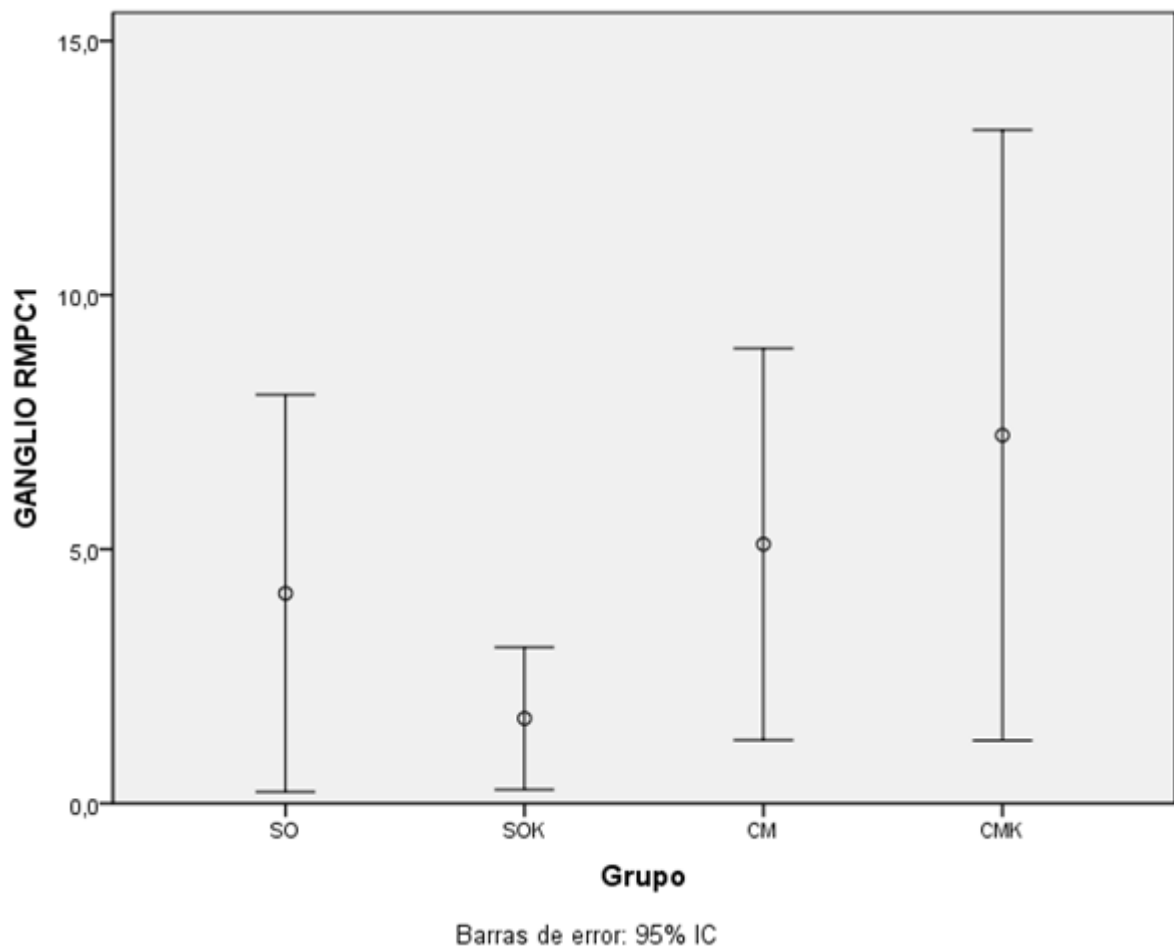
Las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica no sufren un incremento de la densidad de células cebadas mucosas (RMCP-II) y conectivas (RMCP-I) en los ganglios linfáticos mesentéricos respecto a los animales seudooperados (Figuras 52 y 53). Sin embargo, cuando son tratados con Ketotifen, se produce una disminución de la densidad de células cebadas en los animales con pseudointervención, en tanto que los animales colestásicos no presentan disminución del número de células cebadas sino que, por el contrario, aumentan estadísticamente respecto a los animales seudooperados tratados con dicho fármaco (Figuras 52 y 53). Por lo tanto, se podría considerar que el tratamiento con Ketotifen incrementa la densidad de células cebadas

## RESULTADOS

tanto mucosas como conectivas, de los ganglios linfáticos mesentéricos en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, en tanto que reduce su densidad en los animales seudooperados.



**Figura 52** -Concentraciones de RMCP- II en el ganglio de ratas seudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), seudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.



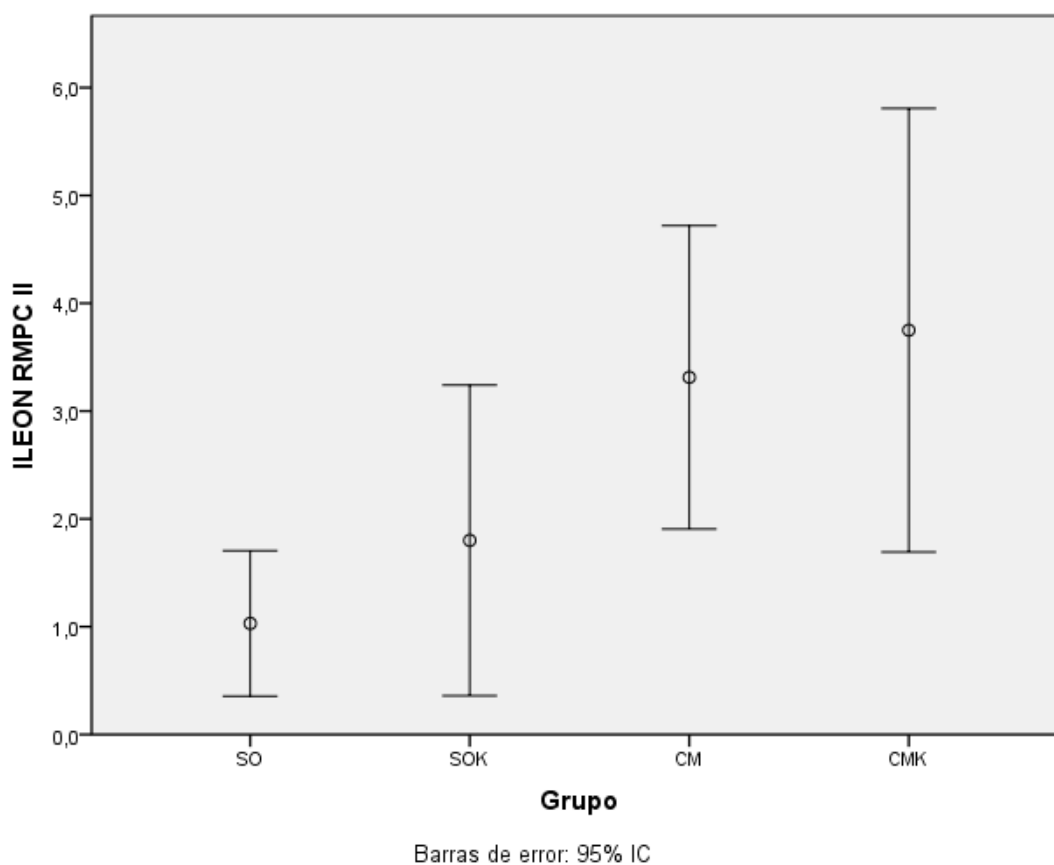
**Figura 53-** Concentraciones de RMCP- I en el ganglio de ratas seudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), seudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.

### **-Íleon**

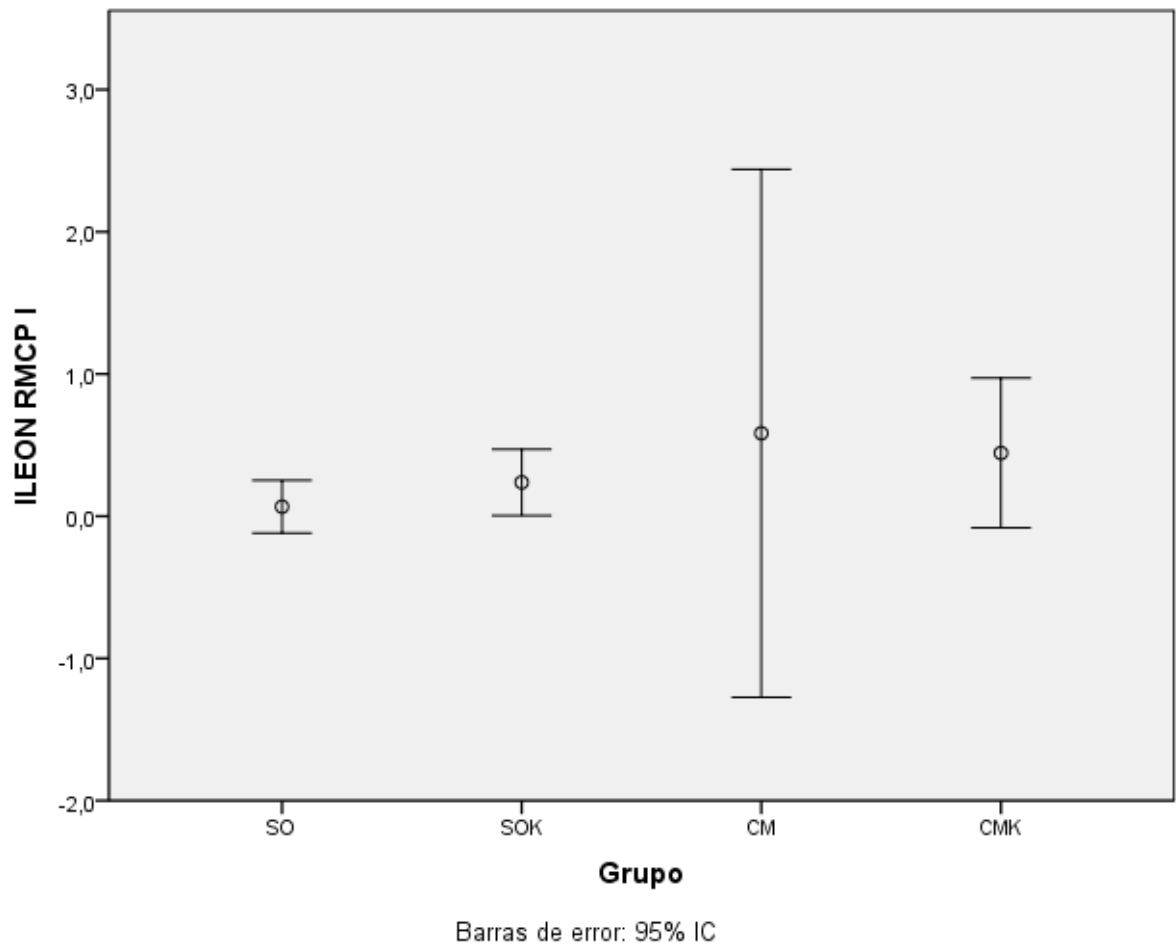
En las ratas con colestasis extrahepática se produce un incremento de la densidad de células cebadas en el íleon. Este incremento es estadísticamente significativo respecto de los animales seudooperados en el caso de las células cebadas mucosas (Figura 54). Cuando los animales seudooperados son tratados con ketotifen, el número de células cebadas mucosas y conectivas en el íleon aumenta, si bien este aumento no es estadísticamente significativo (Figuras 54 y 55). A su vez, las ratas colestásicas tratadas con Ketotifen, no presentan variaciones significativas en la densidad de células cebadas, tanto mucosas como conectivas, respecto a los animales colestásicos no tratados. Se podría concluir que la colestasis extrahepática causa un

## RESULTADOS

incremento de la densidad de células cebadas intestinales, la cual no se modifica ostensiblemente con el tratamiento con Ketotifen ( Figuras 54 y 55).



**Figura 54** -Concentraciones de RMCP- II en el íleon de ratas pseudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.



**Figura 55** -Concentraciones de RMCP I en el íleon de ratas pseudooperadas, (SO), con colestasis microquirúrgica (CM), pseudooperadas tratadas con Ketotifén (SOK) y con colestasis microquirúrgica tratadas con Ketotifén. (CMK). Media  $\pm$  DE.

## ***V. DISCUSIÓN***

El modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata que se ha utilizado en el presente trabajo, se considera que en su evolución a largo plazo cursa con fibrosis biliar e insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal con circulación colateral portosistémica. Sin embargo, entre la 6ª y 7ª semana de evolución postoperatoria, se desarrolla una complicación, la ascitis, que determina un grave pronóstico, con fallecimiento de los animales a la 9ª y 10ª semana de evolución, a pesar del tratamiento con antibióticos de amplio espectro y vitamina K (Aller et al, 2008, Aller et al, 2010).

En el presente trabajo se estudian aquellos animales con colestasis extrahepática microquirúrgica que alcanzan la novena semana de evolución postoperatoria. En este periodo evolutivo, considerado crónico, las ratas presentan hepatomegalia con proliferación ductular y fibrosis, aunque sin pérdida de la arquitectura normal hepática (Aller et al, 1993; Sanchez-Patan et al, 2008; Aller et al, 2008; Aller et al, 2012). Respecto a las alteraciones extrahepáticas destacan la ictericia, coluria, esplenomegalia, hipertensión portal con circulación colateral portosistémica, encefalopatía hepática y ascitis (Aller et al, 2008; Aller et al, 2009; Aller et al, 2010; Aller et al, 2012).

En la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, tanto las alteraciones hepáticas como extrahepáticas poseen una etiopatogenia inflamatoria cuyas características y mecanismos implicados se desconocen (Aller et al, 2012). Entre las hipótesis que se han planteado respecto a los mecanismos patogénicos implicados, tanto en la fibrosis biliar (Aller et al, 2008) como en la hipertensión portal (Prieto et al, 2005; Aller et al, 2007; Moquillaza et al, 2010), destaca la participación de las células cebadas. Por esta razón, en el modelo experimental de colestasis extrahepática en la rata se ha determinado la densidad de células cebadas en el territorio esplácnico, tanto hepático como extrahepático, esto es, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon; así como su respuesta al tratamiento con Ketotifen, un fármaco anti-alérgico y anti-histamínico que inhibe la degranulación calcio-dependiente de células cebadas y produce un bloqueo no competitivo con la histamina en el receptor H<sub>1</sub> (Grant et al, 1990; Migalovich-Sheikhet et al, 2012; Huber 2013).

Entre los hallazgos de este trabajo experimental, se podrían considerar como de mayor relevancia el incremento hepático, esplénico e intestinal de células cebadas en



las ratas con colestasis extrahepática, el cual no se asocia con un correspondiente incremento de células cebadas en los ganglios linfáticos mesentéricos. A su vez, el tratamiento con Ketotifen de las ratas con ictericia obstructiva, no modifica de forma significativa la densidad hepato-intestinal de células cebadas, sin embargo reduce su número en el bazo, en particular de aquellas de tipo conectivo, en tanto que incrementa su densidad en los ganglios linfáticos mesentéricos, y en sobremanera las de tipo mucoso.

En el hígado colestásico, el incremento de mastocitos se podría relacionar con la respuesta inflamatoria inductora de fibrogénesis. En particular, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria hepática secundaria a colestasis posee cierta similitud con la correspondiente a las heridas (Aller et al, 2008; Aller et al; 2012 ). La hipertensión intraductular y el estasis de sales biliares se han propuesto como factores etiopatogénicos fundamentales en la inflamación hepática propia de la ictericia obstructiva. Las sales biliares son potencialmente tóxicas para las células hepáticas y, a elevadas concentraciones, dañan la integridad mitocondrial, produciendo liberación de citocromo C y activación de la apoptosis. Asimismo, la apoptosis también puede ser iniciada en el retículo endoplásmico. El acúmulo de sales biliares puede causar estrés del retículo endoplásmico, con liberación de calcio iónico y la subsiguiente activación de las cascadas apoptóticas, tanto en hepatocitos como en colangiocitos (Aller et al, 2010). A su vez, la energía mecánica excesiva intraductular es causa de aumento de la permeabilidad epitelial y endotelial, con edema y aumento del flujo de líquido intersticial, que en el contexto de la inflamación, puede estimular la diferencia de fibroblastos y remodelar la matriz extracelular, contribuyendo a la fibrosis tisular (Rutkowski y Swartz 2006; Patwari y Lee 2008).

Las células cebadas son residentes habituales, aunque en escaso número, en los tractos portales hepáticos, sin embargo en las patologías hepáticas crónicas como son la cirrosis biliar primaria y la cirrosis alcohólica, su número aumenta invadiendo no solo los espacios portales y tractos fibrosos, sino también los sinusoides (Fallerell et al, 1995; Armbrust et al, 1997). Los mastocitos están presentes en lugares donde se produce fibrogenesis, lo que implica que existen mecanismos que asocian las funciones de estas células consideradas inflamatorias con la fibrosis (Levi-Schaffer y Rubinchik 1995; Aller et al, 2010; Dong et al, 2013). En la evolución de la fibrosis hepática, los mastocitos se cree que están relacionados con la "capilarización sinusoidal", un proceso que transforma los sinusoides en capilares, entre otras causas por depósito de

colágeno en el espacio de Disse (Zimmerman et al, 1999). Una alteración similar ocurre en los hígados con la edad avanzada, denominándose "seudocapilarización" (Grizzi et al, 2013).

Se ha demostrado que Ketotifen posee una acción antifibrótica, por su acción estabilizadora de las células cebadas (Gallant-Behm et al, 2008; Monument et al, 2012), por lo tanto, en las ratas con colestasis, aunque este fármaco no causa disminución de la densidad de mastocitos, si inhibiría la degranulación de mediadores proinflamatorios y, por tanto, reduciría la fibrosis portal, la resistencia hepática al flujo portal y la presión portal. También se ha demostrado que las células cebadas se acumulan en áreas de proliferación ductular biliar (Takeshita y Shibayama 2005) por lo que es posible sospechar que la acción antihipertensiva portal de Ketotifen podría asimismo, estar vinculada a la disminución de la proliferación de membrana de las células cebadas. La relación entre células cebadas y colestasis, sin embargo parece ser más compleja e inversa. Así, la mastocitosis sistémica puede causar colestasis intrahepática con infiltración hepática por células cebadas, edema portal, alteración del epitelio biliar ductular y colestasis centro zonal (Salfyan et al, 1997).

En las enfermedades hepáticas progresivas, el incremento de células cebadas se correlaciona con el grado de fibrosis hepática, lo que sugiere su implicación en la fibrogenesis hepática (Farrell et al, 1995; Sugihara et al, 1999; Francis y Meininger 2010). Incluso en fibrosis o cirrosis hepáticas se ha observado una relación entre la densidad de células cebadas, la lesión hepatocelular, el mRNA codificador de TGF- $\beta_1$  (factor de crecimiento transformador beta-1), la activación de células estrelladas hepáticas y el depósito de colágeno (Grizzi et al, 2003; Jeong et al, 2005). En esencia, la fibrogénesis hepática está protagonizada por miofibroblastos activados que migran y proliferan en la vecindad de las áreas lesionadas e incrementando la matriz extracelular (Ma y Brunt 2012). En este sentido, histamina, un mediador almacenado en grandes cantidades en las células cebadas residentes en los tejidos o maduras, desempeña importantes funciones en las distintas fases de la respuesta inflamatoria que producen fibrosis (Kupietz y Levi-Schaffer 1996). Histamina es un estimulante de la migración de fibroblastos y, por lo tanto, puede contribuir a la producción de fibrosis hepática (Kohyama et al, 2010). A su vez, la inhibición de la actividad de los mediadores de células cebadas y, en particular, de la histamina, por Ketotifen, podría evitar la migración hepática de fibroblastos así como su estimulación para la producción de

colágeno por lo que sería un mecanismo eficaz para revertir la fibrosis hepática (Garbuzenko et al, 2002).

Ketotifen, es un antagonista de receptor  $H_1$  de histamina con propiedades estabilizadoras de células cebadas (Sakamoto et al, 2012). Aunque los mecanismos íntimos de la estabilización de las células cebadas por Ketotifen se desconocen, se ha demostrado que el bloqueo que produce de los canales de calcio, es esencial para evitar la degranulación de las células cebadas. Se ha demostrado que el déficit de calcio intracelular impide la fusión de las vesículas secretoras con la membrana celular y, por lo tanto, las células cebadas no pueden degranular sus factores proinflamatorios (Spataro y Bossman 1976; White et al, 1984). Además, en el hígado colestásico, Ketotifen también podría inhibir la liberación extracelular de HMGB<sub>1</sub> (High mobility group box 1) por células apoptóticas (Ramos et al, 2010). Las células cebadas estimuladas son capaces de liberar redes extracelulares (Extracellular traps (ETs)) constituidas por DNA e histonas, así como otras moléculas con acciones antimicrobianas como por ejemplo, elastasa, catepsina G, proteinasas o defensinas. En particular, las células cebadas por su limitada actividad fagocitaria, compensan su capacidad antimicrobiana, mediante la degranulación de potentes péptidos antimicrobianos como son las catelicidinas, defensinas o proteasas (Goldmann y Medina 2012). También las células cebadas son capaces, una vez estimuladas, de secretar componentes mitocondriales que tienen la propiedad de producir efectos inflamatorios autocrinos y paracrinos (Zhang et al, 2012). Las mitocondrias son bacterias que se hicieron simbióticas con las células eucariotas y, mediante autofagia, las células evitan que sean liberadas así como permiten la generación de mitocondrias funcionales (Twig et al, 2008). Por esta razón, los componentes extracelulares de las mitocondrias se comportan como "auto-patógenos" y causan inflamación tanto local como a distancia. En particular, actuando sobre las células cebadas, estimulan la degranulación y liberación de histamina, prostaglandina D<sub>2</sub>, IL-8, TNF e IL-1 $\beta$  (Zhang et al, 2010). A su vez, estos mediadores proinflamatorios favorecerían la fibrogenesis. Por lo tanto, la acción antiinflamatoria de Ketotifen en el hígado colestásico implicaría su acción a distintos niveles patogénicos, no por reducción del número de células cebadas sino por sus acciones antihistamínicas y estabilizadoras de la membrana celular. Los fármacos antihistamínicos- $H_1$  como Ketotifen, poseen además un significativo efecto inhibidor o modulador de la producción de óxido nítrico (NO) por los fagocitos. Así, Ketotifen inhibe la expresión de iNOS en macrófagos estimulados por

## DISCUSIÓN

---

lipopolisacárido (LPS), lo que supone la capacidad para regular aquellas funciones mediadas por NO (Lojek et al 2011), principalmente las proinflamatorias.

Macrófagos derivados de la médula ósea, se ha descrito que en las reacciones ductulares biliares a la agresión, son capaces de fagocitar los hepatocitos tanto apoptóticos como necrosados, estimulando el excesivo acumulo de miofibroblastos así como la progresiva producción de matriz extracelular y la disregulación de las células endoteliales hepáticas con remodelación vascular que causa fibrosis, hipertensión portal y ascitis (Boulter et al, 2012; Diehl 2012). La inhibición o modulación de la respiración (respiratory burst) fagocitaria que causa Ketotifen, sugiere que en las ratas colestásicas tratadas con este fármaco, se reduciría el efecto estimulante y activador de los miofibroblastos por los macrófagos, con disminución de la producción de colágeno, disminución de la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, reducción de la fibrogénesis hepática y, por tanto, disminución de la resistencia al flujo portal y del grado de hipertensión portal (Ma et al, 2012).

El incremento de células cebadas tanto de tipo mucoso como conectivo en el bazo de los animales con colestasis, también es atribuible a la respuesta fibrogénica que produce en este órgano la hipertensión portal. Aunque tradicionalmente la esplenomegalia en la hipertensión portal ha sido considerada una alteración secundaria a la congestión esplénica por éstasis venoso, se ha demostrado que participan otros factores como son la hiperactividad del tejido linfóide, el incremento de la angiogenesis y la fibrosis (Mejias et al, 2010). En ratas con hipertensión portal prehepática se ha demostrado que el tratamiento con rapamicina, un potente y selectivo inhibidor de mTOR, una serina/treonina quinasa, que regula el crecimiento y la proliferación celular, produce la reducción del tamaño del bazo (44%) así como ejerce inhibición de la proliferación linfocitaria, de la angiogénesis y de la fibrogénesis esplénica (Mejias et al, 2010).

El incremento de células cebadas en el íleon de las ratas con colestasis, posee similar patrón al ya referido en el hígado. Como en dicho órgano, aumenta la densidad ileal tanto de células cebadas de tipo mucoso como de tipo conectivo, y el tratamiento con ketotifen tampoco consigue la reducción de su número. Esta similitud entre el hígado y el intestino delgado, respecto al acumulo de células cebadas en la colestasis extrahepática, representaría la existencia de una homogeneidad de la respuesta inflamatoria esplácnica mediada por mastocitos en la colestasis extrahepática

experimental. La íntima relación funcional e inmunológica entre intestino e hígado, en condiciones fisiológicas, también persiste en caso de patología inflamatoria esplácnica. Así, mediadores inflamatorios de procedencia hepática, pueden contribuir a incrementar la respuesta inflamatoria intestinal y viceversa (Halpern et al, 2003; Neumann et al, 2012). Esta orquestación de la patología inflamatoria esplácnica por el eje hepato-intestinal se atribuye principalmente, a la capacidad de ambos órganos para estimular la respuesta inmune adquirida y a que poseen abundante número de células presentadoras de antígeno (Neumann et al, 2012). En este sentido, la hiperplasia de células cebadas hepatointestinales en la colestasis extrahepática experimental, también participarían activamente ya que poseen la capacidad de presentar antígeno y, por tanto, estimular dicha respuesta inmunológica (Gri et al, 2012; Beunk et al, 2013).

La hipertensión portal propia de la colestasis extrahepática experimental, causaría edema intestinal con aumento del flujo linfático e incluso dilatación vascular de los vasos linfáticos (Ikeda et al, 2001). Esta alteración morfológica y funcional vascular linfática, se asociaría a linfangiogénesis intestinal, que podría ser inducida por mediadores liberados por las células cebadas. Asimismo, estos mediadores podría inhibir la actividad contráctil propulsora de la linfa. En este supuesto, tanto el edema intersticial como la dilatación vascular linfática y la linfangiogénesis podría influenciar la evolución de la enteropatía en la colestasis extrahepática experimental (Aller et al, 2007; Aller et al, 2010).

Las células cebadas constituyen una población celular heterogénea y su morfología y función varía según su localización. Esta heterogeneidad morfofuncional se produce cuando las células cebadas que son producidas en la médula ósea llegan a los tejidos y maduran (Gurish y Boyce 2006; Hallgren y Gurish 2011; Brown y Hatfield 2012; Ball et al, 2013). En esencia, el fenotipo resultante depende del tipo de estímulo ambiental que las células cebadas reciben, lo que explicaría su ambivalente función pro- y anti-inflamatoria, así como su capacidad para inducir tolerancia (Byrne et al, 2008; Limon-Flores et al, 2009; Akbis 2011; Migalovich-Sheikhet et al, 2012; Beunk et al, 2013).

En el intestino, las células cebadas se ha propuesto que inducen la respuesta inflamatoria mediante activación y liberación de histamina, proteinasas y citoquinas (Park et al, 2006; Caughey 2007; Hei et al, 2008; Klooker et al, 2010; Traver et al, 2010). En particular, las proteinasas pueden activar receptores de la familia de

receptores activados por proteinasas (PAR) que, a su vez, modulan la inflamación, la nocicepción, la permeabilidad, la motilidad y el transporte iónico intestinal (Fernandez-Blanco et al, 2013). Por lo tanto, en la enteropatía inflamatoria secundaria a la colestasis extrahepática experimental el incremento ileal de células cebadas mucosas y conectivas, podría constituir un factor etiopatogénico importante. Las células cebadas en el intestino pueden liberar numerosas quimioquinas. La asociación de "stem cell factor" (SCF) e IL-4, incrementa la expresión de quimioquinas por las células cebadas, que se convierten así en fundamentales mediadoras de la respuesta inflamatoria intestinal (Feuser et al, 2012). El receptor de SCF, c-Kit, es una tirosin-quinasa tipo III que se expresa abundantemente en las células cebadas maduras y que promueve la supervivencia (Collington et al, 2011). Asimismo, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1/CCL2) cuya concentración es elevada en el intestino de las ratas colestásicas, también está implicada en el reclutamiento de células cebadas (Halova et al, 2012). MCP-1 al unirse a CCR2 produce la inducción de genes que tienen una significativa implicación en el desarrollo de procesos inflamatorios, incluso causando estrés oxidativo y del retículo endoplásmico con autofagia que, a su vez, puede resultar en muerte celular o bien en diferenciación dependiendo del contexto ambiental en que se encuentren las células (Kolattukudy y Niv 2012). A su vez, la respuesta de células cebadas a SCF es heterogénea (Lewis et al, 2012). Se explicaría así que la redistribución intestinal de células cebadas mucosas y conectivas, sea característica de la enteropatía colestásica experimental y que su actividad se modifique durante la evolución del modelo experimental de colestasis extrahepática en la rata, esto es desempeñando una actividad proinflamatoria en las fases evolutivas iniciales, en tanto que en fases evolutivas consideradas crónicas (6 semanas), predominaría su función remodeladora intestinal, que incluiría la excesiva respuesta angiogénica (Aller et al, 2007). A su vez, los dos subtipos de células cebadas mediante la expresión de moléculas de adhesión y receptores quimiotácticos específicos, determinarían su particular localización y función (Collington et al, 2011; Beunk et al, 2013).

Las células cebadas han sido implicadas en la producción de traslocación bacteriana intestinal en las ratas con hipertensión portal (Llamas et al, 2010). Se ha demostrado que a los 30 días de evolución, la hipertensión portal prehepática, causa traslocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos (Aller et al, 2007; Llamas et al, 2010). Entre los factores intestinales que inducen traslocación bacteriana destacan la disbacteriosis, los trastornos de la motilidad y el aumento de la

permeabilidad intestinal (Wiest y Rath 2003; Garcia-Tsao et al, 1993) los cuales pueden ser causados por mediadores liberados por las células cebadas intestinales, en particular leucotrienos por las células cebadas mucosas, e histamina por las células cebadas conectivas (Collington et al, 2011) ya que las células cebadas mucosas en la rata se localizan principalmente en la mucosa del tracto gastrointestinal, modulando la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal y las células cebadas conectivas se localizan principalmente en la submucosa intestinal y el peritoneo, por lo que regularían la microcirculación esplácnica (Pejler et al, 2010; Collington et al, 2011). En este caso, la hipertensión portal secundaria a la colestasis extrahepática causaría disfunción de la barrera epitelial, con traslocación bacteriana y alteración de la motilidad intestinal que favorece la disbacteriosis (Snoek et al, 2012).

Con independencia de la estimulación neural de las células cebadas del tracto gastrointestinal (Van Nassaw et al, 2007) secundaria a la hiperactividad simpática sistémica (Aller et al, 2007) también se ha descrito la activación del fenotipo inflamatorio en los mastocitos por la hiperactividad del eje renina-angiotensina-aldosterona (Paizis et al, 2002). Así, la liberación de proteasas por las células cebadas (Caughey 2007) activaría los receptores de proteasas (PAR) localizados en las células epiteliales intestinales e incrementaría la permeabilidad de la barrera intestinal (Moriez et al, 2007). Por lo tanto, Ketotifen al estabilizar las células cebadas intestinales, reduciría la permeabilidad epitelial y la traslocación bacteriana intestinal y, en consecuencia, inhibiría o reduciría la respuesta inflamatoria intestinal (Moriez et al, 2007). Asimismo, se ha descrito que la liberación de histamina y triptasa por las células cebadas intestinales, se asocian al correspondiente incremento de estos mediadores inflamatorios en el tejido pulmonar, lo que ha sugerido que la activación de las células cebadas intestinales podrían estimular la migración pulmonar de estas células así como su posterior estimulación (Hung et al, 2007). A su vez, la administración de Ketotifen inhibe la respuesta inflamatoria pulmonar secundaria a la activación de las células cebadas intestinales (Hung et al, 2007). Por lo tanto, Ketotifen no sólo es eficaz en procesos inflamatorios intestinales como son el síndrome de intestino irritable (Klooker et al, 2010), la enfermedad inflamatoria intestinal (Beunk et al, 2013) o el ileo postoperatorio (The et al, 2009), sino también en las alteraciones sistémicas causadas por esta patología inflamatoria esplácnica (Hung et al, 2007).

La respuesta inflamatoria intestinal en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica podría pues, estar mediada por células cebadas, en cuyo caso el

tratamiento por Ketotifen modularía dicha complicación. Este hipotético planteamiento patogénico de la enteropatía en la ictericia obstructiva, no sólo se fundamenta en los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental, sino en estudios previos en un modelo de hipertensión portal prehepática (Aller et al, 2007). En ratas con hipertensión portal por triple ligadura estenosante de la porta, se ha demostrado también que se produce un significativo incremento del número de células cebadas, tanto en el tracto intestinal como en los ganglios linfáticos mesentéricos (Diez-Arias et al, 2001; Prieto et al, 2005; Aller et al, 2007). En el tracto intestinal las células cebadas aumentan en la submucosa duodenal y dicho aumento se correlaciona con la densidad de los vasos sanguíneos (Diez-Arias et al, 2001). El incremento de la angiogenesis en los órganos esplácnicos se considera en la actualidad una característica patológica de la hipertensión portal (Fernandez et al, 2004; Fernandez et al, 2007; Aller et al, 2007; Fernandez et al, 2009) y es causada por el aumento en la expresión de factores angiogénicos principalmente el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Fernandez et al 2009). Las células cebadas podrían participar en la regulación de esta respuesta angiogénica esplácnica mediante la síntesis y liberación de citoquinas y factores de crecimiento. Se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica, crónica en la colestasis microquirúrgica experimental podría estar mediada por células cebadas y presentar un incremento de las concentraciones esplácnicas de IL-4 e IL-10, en cuyo caso podría ser considerada una respuesta tipo Th<sub>2</sub> (Garcia-Dominguez et al, 2010). En este supuesto, las células cebadas intestinales así como las existentes en los ganglios linfáticos mesentéricos en este modelo experimental de ictericia obstructiva producirían citoquinas de tipo Th<sub>2</sub>, como son IL-4, IL-10 e IL-13, así como factores de crecimiento (VEGF) y quimioquinas que regularían el reclutamiento y supervivencia de otras células inmunes, entre las que se incluirían granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos. Asimismo, las células cebadas podrían modular el fenotipo y la función de dichas células inflamatorias reclutadas en el intestino (Theoharides et al, 1982; Sarchio et al, 2012). En particular, histamina que es sintetizada, almacenada y liberada por las células cebadas, principalmente conectivas, podría ejercer una función moduladora de la respuesta inmunológica intestinal ya que puede cambiar el balance Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> mediante su acción en receptores de histamina linfocitarios. A su vez las células cebadas acumulan en sus granulos gran cantidad de ácido araquidónico que es el precursor de prostanoïdes y cuya liberación crónica podría estar implicada en la producción de una respuesta inflamatoria crónica. Asimismo, IL-33 es capaz de causar



una producción selectiva de leucotrienos, TNF-alfa e IL-6 por las células cebadas (Dichlberger et al, 2013)

La ictericia, también es un factor de gran importancia en este modelo experimental de colestasis en tanto que es mediador de la respuesta inflamatoria. La bilirrubina, en particular, posee numerosas propiedades bioquímicas y biológicas (Vitek y Schawertner 2007). La Bilirrubina ejerce una acción protectora contra el estrés oxidativo (Vitek y Schawertner 2007), tiene propiedades antiapoptóticas y antimutagénicas (Bulmer et al, 2008) y, por último, es un potente inmunomodulador (Moseley 1999). En un modelo de endotoxemia en el ratón se ha demostrado que una sola dosis de bilirrubina ejerce efecto antioxidante así como una intensa actividad antiinflamatoria (Moseley 1999). Por lo tanto, en este modelo experimental de ictericia obstructiva no se debe excluir el importante efecto antioxidante e inmunomodulador que realizaría la bilirrubina.

En el intestino de ratas colestásicas, MCP-1, IL-4 e IL-13 liberados por células cebadas pueden atraer otras células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. A su vez, la liberación de IL-13 puede ser potenciada por la presencia de IL-4, que es capaz de regular el fenotipo de las células cebadas induciendo la producción de citoquinas tipo Th<sub>2</sub> entre las cuales se incluyen IL-13 e IL-10 (Bischoff 2009); IL-13 puede contribuir a perpetuar la respuesta Th<sub>2</sub> bien induciendo la producción de quimioquinas reclutadoras de linfocitos Th<sub>2</sub>, o por mecanismo autocrino, estimulando su propia producción por células cebadas e incluso por basófilos y eosinófilos (Fuschiotti 2011). IL-13 asociada a IL-4 e IL-10 también regula una activación alternativa de macrófagos que contribuyen a la patogenia de las respuestas alérgicas así como fibrogénicas (Karp y Murray 2012). Por último, IL-13 es una citoquina que se ha demostrado que participa en múltiples procesos inflamatorios intestinales, incluyendo la colitis ulcerosa y la esofagitis eosinofílica, donde causa un proceso de remodelación en el que participan fibrogénesis y angiogénesis (Mannon y Reinish 2013).

MCP-1/CCL2 es una de las quimioquinas mejor estudiadas de las que son expresadas por células inflamatorias y del estroma (Halova et al, 2012). En la enteropatía hipertensiva portal, las células endoteliales podrían producir MCP-1 contribuyendo así al reclutamiento de monocitos, neutrófilos y linfocitos y facilitando la diapédesis de estas células al espacio intersticial intestinal. A su vez, estas células

infiltradas en el intersticio producirían mediadores inflamatorios que activarían a las células residentes intestinales y, por lo tanto, iniciarían y facilitarían la progresión de la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal (Kolattukudy y Niu 2012). Por esta razón, interferir en la interacción entre MCP-1 con CCR2 puede ser un mecanismo beneficioso en la hipertensión portal ya que suprimiría la respuesta inflamatoria intestinal así como sus efectos sistémicos. En otros tipos de inflamación intestinal, como la colitis ulcerosa, se ha demostrado también el incremento en la expresión de MCP-1 mRNA y proteína en macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales de la mucosa inflamada. Estos resultados han permitido proponer el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de MCP-1 de la enfermedad inflamatoria intestinal (Yadav et al, 2010).

La angiogénesis exacerbada esplácnica en la hipertensión portal, no sólo afecta al tracto gastrointestinal, sino que es causante del desarrollo de colaterales portosistémicas (Fernandez et al, 2004) esplenomegalia (Mejias et al, 2010) y vasculopatía venosa mesentérica (Aller et al, 2007) en la rata. Las células cebadas, se ha propuesto que podrían desempeñar una actividad orquestadora de la angiogénesis esplácnica en la hipertensión portal experimental (Aller et al, 2007). En la enteropatía hipertensiva portal, la hipoxia de la mucosa intestinal, al inducir la expresión de factor inducible de hipoxia (HIF)-1 estimularía la respuesta inflamatoria así como la angiogénesis (Colgan y Taylor 2010; Roy y Sen 2012). La hipoxia inhibe HIF-hidrolasas, inhibiendo a su vez la degradación de HIF-1 y, por tanto, favoreciendo su estabilización (Aragones et al, 2008; Roy y Sen 2012). En la enteropatía hipertensiva portal experimental se ha propuesto que la redistribución del flujo sanguíneo produciría un proceso de isquemia-revascularización, con una respuesta inflamatoria secundaria cuyo resultado a largo plazo sería la remodelación angiogénica del tracto gastrointestinal (Aller et al, 2007; Aller et al, 2010).

Las células cebadas una vez activadas adquieren gran plasticidad, lo que les permite responder a los distintos requerimientos en la cual se integran (Galli et al, 2005). Así, las células cebadas secretan numerosas aminas biogénicas, como histamina y serotonina, así como otros mediadores implicados en el proceso de neovascularización como son quinasas, citoquinas y factores de crecimiento, así PDGF y VEGF (Grützka et al, 1998; Nienartowicz et al, 2006; Soucek et al, 2007). La hiperemia esplácnica, el aumento de vascularización esplácnica y el desarrollo de circulación colateral portosistémica en ratas con hipertensión portal son en parte procesos angiogénicos dependientes de VEGF (Angermayr et al, 2006). Por lo tanto, la

producción y la liberación de factores angiogénicos (VEGF) y de factores de crecimiento (PDGF, FGF básico) por las células cebadas (Galli et al, 2005) podría tener un papel importante en la modulación de la angiogénesis esplácnica en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica. Asimismo, las ratas con hipertensión portal cursan con alteraciones inflamatorias, mediadas por diversas quimioquinas, en el eje esplácnico-cerebral (Merino et al, 2009; Merino et al, 2011). Las ratas con hipertensión portal prehepática presentan aumento de CXCR4/SDF-1 $\alpha$  en el hipocampo y en el cerebelo, asociado con un incremento de CX3CR1/fractalkina en el íleon y en los ganglios linfáticos mesentéricos (Merino et al, 2011). El aumento de CXCR4/SDF-1 $\alpha$  en el hipocampo podría estar relacionado con una actividad tanto angiogénica como reparadora neuronal y remodeladora. A su vez, el incremento de CX3CR1 en el íleon podría inducir la migración de monocitos, lo cual contribuiría al desarrollo de inflamación intestinal y, en particular, de la enteropatía hipertensiva portal. Éste tipo de enteropatía se caracteriza por cambios tanto vasculares como epiteliales de etiología supuestamente inflamatoria (Aller et al, 2007). A la vasodilatación y la angiogénesis, que son alteraciones estructurales vasculares propias de la enteropatía hipertensiva portal (Misra et al, 1997), se asocia un proceso de remodelación epitelial consistente en la hiperplasia de las células caliciformes con hipersecreción de mucina, que son a su vez, alteraciones características de la remodelación epitelial que ocurre en el tracto respiratorio en procesos inflamatorios crónicos como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Chung 2001; Fahy 2001). El moco secretado por las células caliciformes en la luz intestinal, constituye un componente de la defensa de la mucosa, por lo que en la enteropatía hipertensiva portal esta hipersecreción podría estar mediada, entre otros factores, por las células cebadas (Penissi et al, 2003).

Puesto que fractalkina estimula la angiogénesis activando las vías de señalización Raf-1/MEK/ERK y PI2K/AKT/eNOS/NO a través de su unión al receptor CX3CR1 acoplado a proteína G (Lee et al, 2006), la interacción entre fractalkina y CX3CR1 podría contribuir a la patogenia vascular de la enteropatía hipertensiva portal (De las Heras et al, 2011). Fractalkina también puede actuar como un factor quimioatrayente de células cebadas (El-Shazly et al, 2006) explicándose así el incremento de la infiltración de células cebadas que ocurre en los ganglios linfáticos mesentéricos, tanto de ratas con hipertensión portal prehepática (Prieto et al, 2005; Moquillaza et al, 2010) como en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica

en el presente trabajo, en que se observa que dicho incremento se produce a expensas de la subpoblación de células cebadas de tejido conectivo. Curiosamente, heparina, un polisacárido variante de heparan sulfato implicado en la fisiopatología de numerosos procesos incluyendo los inflamatorios, es producido principalmente por las células cebadas de tipo conectivo y se ha demostrado su íntima relación con mecanismos angiogénicos en particular en la neovascularización tumoral (Lindah y Kjellen 2013). Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos que interactúan con múltiples proteínas y en la actualidad son considerados los protagonistas de la patogenia en numerosas enfermedades. Su producción por células cebadas, añade nuevas perspectivas terapéuticas a los procesos inflamatorios incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal (Rönnberg et al, 2012; Lindah y Kjellen 2013; Anower-E-Khuda et al, 2013). En particular, en las células cebadas conectivas la actividad enzimática de triptasa en complejos triptasa-heparina atenúa la respuesta inflamatoria (Anower-E-Khuda et al, 2013). La importancia progresiva que se ha otorgado a las células cebadas en las enfermedades vasculares podría ser extrapolada a su potencial protagonismo en la vasculopatía secundaria a la insuficiencia hepática crónica y a la hipertensión portal con independencia de su etiología (Farha et al, 2012).

Sin embargo, aunque las células cebadas desempeñan un papel fundamental en la regulación de los procesos inflamatorios, tanto mediando la inmunidad innata como adquirida, sus mecanismos son en la actualidad desconocidos (Frenzel y Hermine 2013). El hallazgo en el presente trabajo experimental del paradójico incremento de las células cebadas mucosas y conectivas en los ganglios linfáticos de los animales colestásicos tratados con Ketotifen, así como la incapacidad de éste fármaco de reducir la densidad de las células cebadas mucosas y conectivas en el eje hepático-intestinal, sugiere que Ketotifen potencia la angiogénesis propia de la hipertensión portal en este modelo experimental de insuficiencia hepática crónica. Ketotifen es eficaz en la profilaxis de algunos tipos de asma aunque su mecanismo no es totalmente entendido (Galli et al, 2008; Galli y Tsai 2012). Sin embargo, recientes estudios experimentales evidencian que Ketotifen tiene entre otros efectos adicionales, al antiinflamatorio, el aumento de la sensibilidad a insulina, el incremento del peso corporal y la reducción de la obesidad (Wang y Shi 2011). Aunque las células cebadas contribuyen a la inflamación, proliferación y remodelación en las enfermedades vasculares (Kennedy et al, 2013), su estabilización produce resultado adversos. Así en un modelo de hipertensión arterial pulmonar, el tratamiento con cromoglicato, un fármaco

estabilizador de membrana de células cebadas potencia la remodelación adversa vascular, sin afectar a las alteraciones hemodinámicas (Bartelds et al, 2012).

En las ratas colestásicas se ha constatado un efecto proangiogénico esplácnico de Ketotifen, posiblemente relacionado con el incremento de células cebadas, en particular mucosas, en los ganglios linfáticos mesentéricos. La persistencia en el incremento de células cebadas hepato-intestinales en los animales con ictericia obstructiva tratados con Ketotifen, sugiere que las células cebadas principalmente mucosas, están implicadas en el proceso angiogénico esplácnico que tiene como consecuencia el incremento de la vasculopatía venosa mesentérica y de la circulación colateral portosistémica, que a su vez reduce el grado de hipertensión portal en este modelo experimental. Por lo tanto, Ketotifen en la insuficiencia extrahepática, favorecería la remodelación vascular esplácnica al estimular la angiogénesis y, por esta razón, aumenta la circulación colateral portosistémica y, por tanto, agrava sus consecuencias entre las que destacan la encefalopatía hepática (Buob et al, 2011; Rahimi y Rockey 2011).

En las ratas con ictericia obstructiva, el hipogonadismo asociado a disminución de la producción de testosterona, causa la estrogenización con aumento de los receptores hepáticos de estrógenos (Murray et al, 1987; Porter et al, 1987). Asimismo, en la colestasis se reduce considerablemente la excreción biliar de estrógenos (Sherlock 1989). Las hormonas sexuales poseen una acción determinante en la evolución de la respuesta inflamatoria así como en la angiogénesis resultante (Guo y Di Pietro 2010). En situaciones de isquemia o hipoxia, los estrógenos confieren mayor protección que los andrógenos por su actividad angiogénica entre otros mecanismos, así como antiinflamatoria (Ritzel et al, 2012). Por esta razón, la influencia del hiperestrinismo propia de la insuficiencia hepática crónica en la exacerbada respuesta angiogénica esplácnica, se agravaría a su vez en los animales con ictericia obstructiva tratados con Ketotifen ya que este fármaco induce mayor atrofia testicular. A su vez, la existencia de receptores estrogénicos en las células cebadas (Zhao et al, 2001) explicaría la influencia nociva de Ketotifen en la ictericia obstructiva en tanto que es inductor de hipogonadismo e hiperestrinismo, que activarían los mastocitos favoreciendo su reclutamiento esplácnico. En este sentido, tanto estradiol como progesterona, regulan la migración, maduración y degranulación de células cebadas en las fases iniciales de la gestación, estimulando este mecanismo la angiogénesis (Jensen et al, 2010; Woidacki et al, 2013). Estos resultados, que sugieren la estimulación de la

actividad angiogénica por Ketotifen en el área esplácnica, afectan al territorio venoso portal, en tanto que los autores que preconizan la actividad antiangiogénica de los estabilizadores de células cebadas utilizan modelos experimentales de patología vascular arterial (Wang y Shi 2011; Zhang et al, 2011). Así, la actividad antiangiogénica de Ketotifen ha demostrado, en un modelo experimental de aneurisma aórtico abdominal, que atenúa su formación, entre otros mecanismos, por reducción de la actividad de las proteasas de los mastocitos. Tanto triptasa como quimasa, causan apoptosis de células vasculares y estimulan la angiogénesis al degradar la matriz extracelular (Sun et al, 2009; Zhang et al, 2011). Por mecanismos similares se cree que las células cebadas participan en la producción de otras enfermedades cardiovasculares como son la arteriosclerosis y las reestenosis arteriales post-angioplastia (Kennedy et al, 2013).

El modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se considera apropiado para estudiar la insuficiencia hepática crónica y la hipertensión portal, ya que produce fibrosis biliar (Aller et al, 2010) sin embargo, a las seis semanas de evolución se instaura la ascitis, una alteración que sugiere la existencia de insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica y que agrava el pronóstico de los animales (Aller et al, 2010). En la clínica humana, el fallo hepático agudo-sobre-crónico se considera un proceso secundario al deterioro agudo de la función hepática en pacientes cirróticos y cursa con la insuficiencia de otros órganos así como con elevada mortalidad a corto plazo (Mookerjee 2011, Jalan et al, 2012; Moreau et al, 2013). Ya que la insuficiencia hepática crónica se asocia a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Cazzaniga et al, 2009), cuando incide un factor precipitante, desencadena la descompensación brusca del paciente con graves alteraciones hemodinámicas entre las que destacan la elevación de la presión portal y el fracaso multiorgánico (Olson et al, 2011; Abdel-Khalek et al, 2011; Jalan et al, 2012).

Entre los mecanismos etiopatogénicos descritos para explicar la aparición de ascitis en la insuficiencia hepática crónica destacan la retención de sodio y agua, el incremento de la permeabilidad vascular venosa esplácnica, la endotoxemia y las alteraciones vasculares linfáticas esplácnicas (Cardenas y Arroyo 2007; Arroyo et al, 2008; Aller et al, 2010; Jalan et al, 2012). La insuficiencia hepática crónica, se asocia con disfunción linfática, caracterizada por aumento del flujo linfático esplácnico asociado a dilatación vascular linfática y linfangiogénesis. Estas alteraciones a su vez podrían ser causadas por el incremento del flujo en el espacio intersticial de los

órganos y tejidos espláncnicos que no solo causa disfunción linfática, sino que también pueden agravar la disfunción cardiovascular con circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica propia de la insuficiencia hepática crónica (Arroyo et al, 2008; Aller et al, 2010; Jalan et al, 2012). En éste complejo mecanismo fisiopatológico productor de ascitis en la insuficiencia hepática crónica descompensada (Jalan et al, 2012), las células cebadas podrían ejercer una actividad nociva, mediante la liberación de sustancias vasoactivas, así como enzimas proteolíticas que favorecerían el edema intestinal y, por lo tanto, el flujo linfático, favoreciendo así, la producción de ascitis. En este sentido, se ha propuesto la existencia, en la insuficiencia hepática crónica con ascitis, de un eje patológico intersticial-linfático-peritoneal cuya actividad resultaría fundamental para la producción y mantenimiento del líquido ascítico. Esta hipótesis se fundamenta en la consideración de la ascitis como la recapitulación de ancestrales mecanismos filogenéticos, relacionados con la producción del líquido amniótico, durante la evolución animal cuando abandona el ambiente marino (Aller et al, 2010).

La implicación patogénica de las células cebadas en la ascitis secundaria a la descompensación de la insuficiencia hepática crónica en la ictericia obstructiva experimental, es sugerida por los resultados del presente trabajo experimental. Así, el incremento en la liberación de IL-13 en el líquido ascítico de las ratas con colestasis, se reduce mediante el tratamiento con Ketotifen . IL-13 desempeña una actividad fundamental en la orquestación de la respuesta inmunológica de tipo Th<sub>2</sub>, que es la propia de las reacciones alérgicas así como de la que provocan las parasitosis helmínticas (Brightling et al, 2010). Entre las células productoras de IL-3, se incluyen las células cebadas que son protagonistas de las respuestas inmunológicas de tipo 2 (Brightling et al, 2010). En la insuficiencia hepática crónica descompensada, IL-6 podría estimular la liberación de IL-13 por las células cebadas espláncnicas y, en particular, por aquellas de localización peritoneal (Cray et al, 2009).

Asimismo, las células cebadas por su íntima relación con los nervios (Schemann y Camilleri, 2013), inducen la liberación del péptido regulador del gen calcitonina (CGRP), un neuropéptido con acción vasodilatadora y causante del aumento de permeabilidad vascular (Kaur et al, 2009). El incremento de las concentraciones plasmáticas de CGRP en pacientes cirróticos con ascitis o síndrome hepatorenal, sugiere que este potente vasodilatador podría contribuir en la producción de las alteraciones hemodinámicas que causan dichas complicaciones graves (Gupta et al, 1992). A su vez, en las ratas colestásicas con ascitis, se ha demostrado tanto el



incremento del CGRP en el líquido ascítico, como su disminución cuando los animales son tratados con ketotifen . Ya que las células cebadas peritoneales pueden inducir la liberación de CGRP por los nervios sensitivos (Kaur et al, 2009), se podría considerar que en los animales colestásicos la interacción de célula cebada peritoneal con los terminales sensitivos peritoneales ocasionaría la liberación de CGRP, que a su vez, incrementaría tanto el flujo sanguíneo peritoneal como el aumento de la permeabilidad vascular, favoreciendo por esta razón, el desarrollo de ascitis en este modelo experimental de colestasis extrahepática. También los vasos linfáticos están inervados por nervios sensitivos que contienen CGRP y, por este motivo, podrían inhibir la actividad vasomotora linfática y causar éstasis linfático, que es un factor inductor de ascitis (Hosaka et al, 2006). Es posible que la liberación de mediadores inflamatorios, como CGRP, debido a la activación de las células cebadas, inhiba la motilidad vascular linfática, aumente la permeabilidad venosa postcapilar e incremente el tránsito intersticial y linfático del exudado inflamatorio esplácnico en las ratas colestásicas, favoreciendo así la producción de ascitis. A su vez, el tratamiento con Ketotifen reduciría la liberación de IL-13 y CGRP, inhibiría los mecanismos microcirculatorios sanguíneos y linfáticos esplácnicos productores del incremento de la producción y tránsito del líquido intersticial y linfático, así como de la producción de líquido ascítico. Esta acción terapéutica de Ketotifen, también ha sido demostrada en la ascitis eosinofílica (Casella et al, 2011) secundaria al síndrome eosinofílico idiopático (Weller y Buble 1994). Las proteasas liberadas por células cebadas en la intermediación de las células mesoteliales peritoneales, también pueden causar aumento de la permeabilidad de la barrera peritoneal y coadyuvar a la producción de ascitis en la colestasis extrahepática experimental.

La distribución de las subpoblaciones de células cebadas estudiadas en el modelo de insuficiencia hepática crónica por colestasis extrahepática en la rata, contrasta con la previamente descrita en la insuficiencia hepática crónica por anastomosis portocava terminolateral utilizando también ratas Wistar (Aller et al, 2012). La atrofia hepática por privación del flujo venoso portal se acompaña de la depleción de células cebadas tanto mucosas como conectivas. Se ha considerado que en este modelo experimental de insuficiencia hepática crónica, las células cebadas hepáticas en número reducido, no serían suficientes para proteger al parénquima de la atrofia y, por lo tanto, se les otorga una función defensiva atribuible a su capacidad para sintetizar citoquinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento (Aller et al,



2012). Por el contrario, su excesiva presencia en los hígados colestásicos potenciaría la proliferación biliar y la fibrosis portal. La respuesta proliferativa del sistema biliar intrahepático, el cual tiene un origen en células progenitoras diferentes del sistema biliar extrahepático (Spence et al, 2009), se considera una colangiopatía de naturaleza inflamatoria (Park 2012), así como una reacción ductular que posee patrones embrionarios, similares a la placa ductal (Desmet 2011). Esta similitud se debe a que ambas estructuras, patológica y embrionaria, tienen en común su composición por un pequeño vaso sanguíneo central, ya vénula o un sinusoides alterado en la colestasis, que se rodea de mesénquima, tejido conjuntivo y una doble capa de células epiteliales de tipo biliar (Desmet 2011). Entre los tipos de reacciones ductulares que han sido descritos, el resultado de la obstrucción de la vía biliar extrahepática, se ha clasificado como reacción ductular de tipo 1 y representaría el resultado de la interacción entre el estroma inflamatorio y el epitelio biliar (Desmet 2009). Se podría concluir que tanto las placas ductales embrionarias, como las malformaciones y las patologías post-natales, causantes de colestasis, representan reacciones ductulares (Desmet 2009; Desmet 2011) en cuyo caso se podría sospechar que se producen por similares mecanismos y, por tanto, en la colestasis la respuesta inflamatoria consiguiente induciría la recapitulación del proceso embrionario que protagoniza las fases iniciales del desarrollo del hígado. Esta hipótesis validaría a los modelos experimentales de ictericia obstructiva, para el estudio de los mecanismos que participan en la producción de atresia biliar (Venkatanarasimha et al, 2011; Erlinger 2011; Azmaiparashvili et al, 2012; Strazzabosco y Fabris 2012) así como a la respuesta inflamatoria y sus mediadores en la transdiferenciación de hepatocitos en células ductulares en la ictericia obstructiva (Nishikawa et al, 2013).

El estudio comparativo de los modelos de insuficiencia hepática en la rata por shunt portocava término-lateral y colestasis extrahepática respecto de la densidad de células cebadas en el intestino delgado (íleon), también presenta diferencias ya que, si bien aumentan las células cebadas conectivas en ambas patologías, no existe similar respuesta de las células cebadas de tipo mucoso que se reducen post-anastomosis portocava y aumentan en la ictericia obstructiva (Aller et al, 2012). Es obvio que la inexistencia de hipertensión portal en el primer caso, otorga a la respuesta inflamatoria esplácnica diferentes características patogénicas y, por esta razón, la distribución de mastocitos en los ganglios linfáticos mesentéricos es opuesta entre ambos modelos experimentales, puesto que se reduce el número de ambos subtipos, mucoso y

conectivo, en las ratas con derivación portosistémica quirúrgica y, por el contrario, aumenta el subtipo conectivo en las ratas con colestasis y derivación portosistémica por colaterales neoformadas (Aller et al, 2012).

En suma, los animales con anastomosis portocava y atrofia hepática, sufren depleción esplácnica de células cebadas en tanto que en las ratas con colestasis extrahepática, se produce hiperplasia esplácnica de células cebadas asociada a hipertensión portal y respuesta angiogénica, que a su vez, son potenciadas por el tratamiento con el antihistamínico Ketotifen. Entre los hipotéticos mecanismos por los que se producen estas alteraciones, se podría destacar la implicación de factores angiogénicos producidos y liberados por las células cebadas esplácnicas en la colestasis experimental extrahepática microquirúrgica como respuesta a la inflamación esplácnica causada por la insuficiencia hepatocelular colestásica. La ineficacia del fármaco Ketotifen para reducir el número de mastocitos esplácnicos, así como su respuesta angiogénica, sugiere la existencia de mecanismos alternativos y compensadores a los correspondientes a histamina, los cuales podrían potenciar tanto la hiperplasia de células cebadas esplácnicas, como la respuesta inflamatoria angiogénica. En este supuesto, el tratamiento con Ketotifen favorecería las complicaciones propias de la respuesta inflamatoria crónica esplácnica, que incluye la angiogénesis y, por tanto, el mayor desarrollo de circulación colateral portosistémica y sus consecuencias nocivas y agravantes del pronóstico, como son la encefalopatía hepática y la hemorragia por varices. Por el contrario, Ketotifen por su acción antihistamínica sería eficaz en el tratamiento de la respuesta inflamatoria aguda esplácnica inicial postoperatoria en el modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, así como en la respuesta inflamatoria esplácnica aguda-sobre-crónica, que se instaura durante la evolución a largo plazo de este modelo experimental por la incidencia de factores que causan su descompensación (Sanchez-Patan et al, 2008a; Sanchez-Patan et al, 2008b).

El protagonismo etiopatogénico de las células cebadas en la patología esplácnica secundaria a la colestasis extrahepática, permitiría su inclusión entre los Síndromes de Activación de Células Cebadas, beneficiándose así del estudio de otras patologías con similares mecanismos implicados (Cai et al, 2011; Haenisch et al, 2012; Valent 2013).

## ***VI. CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

---

1. En el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, que cursa con insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal por fibrosis biliar, se ha demostrado la existencia de un incremento hepático, esplénico e ileal de células cebadas.
2. En el aumento esplácnico de células cebadas en dicho modelo experimental de ictericia obstructiva participan, tanto las células cebadas de tipo mucoso, como las células cebadas de tejido conectivo.
3. El tratamiento con Ketotifen, un fármaco estabilizador de células cebadas, no produce cambios significativos del número de células cebadas hepato-intestinales en dicho modelo experimental. Sin embargo, incrementa significativamente la densidad de ambos fenotipos de mastocitos, mucoso y de tejido conectivo en los ganglios linfáticos mesentéricos.
4. Ketotifen reduce la presión portal y las concentraciones de IL-13 y CGRP en el líquido ascítico de las ratas colestásicas, en tanto que, agrava el hipogonadismo y el grado de circulación colateral portosistémica.
5. Se concluye que en el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica, Ketotifen aunque puede reducir las complicaciones propias de la insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica, como por ejemplo la ascitis, exacerba la angiogénesis esplácnica, una complicación propia de la insuficiencia hepática crónica y, por tanto, favorece el desarrollo de la circulación colateral portosistémica.

## ***VII-BIBLIOGRAFÍA***

- Abdeldayem H, Ghoneim E, Refaei AA, Abou-Gabal A. Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. *Hepatol Int* 2007;1:444-8.
- Abdel-khalek EE, El-fakhry A, Helaly M, Hamed M, Elbaz O. Systemic inflammatory response síndrome in patients with liver cirrosis. *Araba J Gastroenterol* 2011; 12: 173-7.
- Abounassif MA, El-Obeid HA, Gadkariem EA. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. *J Pharm Biomed Anal* 2005;36:1011-8.
- Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl.* 2010;16:1016-32.
- Abraham SC, Poterucha JJ, Rosen CB, Demetris AJ, Krasinskas AM. Histologic abnormalities are common in protocol liver allograft biopsies from patients with normal liver function tests. *Am J Surg Pathol* 2008;32:965-73.
- Abraldes JG, García-Pagán JC. Animal models for the study of portal hypertension. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29:51-9.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1101-10.
- Akbis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nature Medicine* 2011; 18: 736- 736-49. doi: 10.1038/nm.2754.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim* 2005;54:155-61.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell –cell adhesion and the extracellular matrix . En: *Molecular biology of the cell*. Edit. Garland Publishing, Inc. New York. Chapter 12, 1983, pp. 673-715.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämisch R, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2867-76.
- Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2011;178:175-86.
- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 10-14.

- Aller MA, Arias JL, Lorente L, Nava MP, Durán HJ, Arias J. Neuro-immune-endocrine functional system and vascular pathology. *Med Hypotheses* 2001;57:561-9.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2004;24:442-7.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg* 2004;17:99-104.
- Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Angulo A, Sánchez-Patán F, Calderón A, Vergara P, Arias J. Hepatic lipid metabolism changes in short- and long-term prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:6828-34.
- Aller MA, Nava MP, Cuellar C, Chivato T, Arias JL, Sanchez-Patan F, de Vicente F, Alvarez E, Arias J. Evolutive phases of experimental prehepatic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1127-33.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model* 2007; 4: 44
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med.* 2007;5:44.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008;1:6.
- Aller MA, Vara E, García C, Méndez M, Méndez-López M, Mejía I, López L, Arias JL, Arias J. Prehepatic portal hypertension worsens the enterohepatic redox balance in thioacetamide-cirrhotic rats. *Pathophysiology* 2008;15:233-42.
- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. Laboratory Rat Management. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009a: 7-31.
- Aller MA, Prieto I, Cruz A, Losada M, Arias JI, García-Domínguez J, Argudo S, Arias JL, Arias J. Extrahepatic Cholestasis En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009b: 137-156.
- Aller MA, Arias J. Microsurgery: Instruments and Techniques En: *Microsurgery in Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009: 32-48.
- Aller MA, Nava MP. Anesthesia, Analgesia and Postoperative Care. En: *Microsurgery in Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009: 49-70.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int* 2009;29:1132-40.

- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns* 2010;36:292-4.
- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:651-61.
- Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: Gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model* 2010c; 7:37.
- Aller MA, Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflamm* 2010;2010:148689.
- Aller MA, Arias N, Prieto I, Argudo S, Gilsanz C, Lorente L, Arias JI, Arias J. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 2012; 4: 199-208.
- Aller MA, Blanco-Rivero J, Arias JI, Balfagon G, Arias J. The wound-healing response and upregulated embryonic mechanisms: brothers-in-arms forever. *Exp Dermatol* 2012; 21: 497-503.
- Aller MA, Martinez V, Corcuera MT, Benito J, Traver E, Gomez-Agudo F, Vergara P, Arias J. Liver impairment after portacaval shunt in the rat: The loss of protective role of mast cells? *Acta Histochem* 2012; 114: 301-10.
- Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S, Gaudio E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol* 2006;12:3537-45.
- Alvaro D, Macarri G, Mancino MG, Marzioni M, Bragazzi M, Onori P, Corradini SG, Invernizzi P, Franchitto A, Attili AF, Gaudio E, Benedetti A. Serum and biliary insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor in determining the cause of obstructive cholestasis. *Ann Intern Med* 2007;147:451-9.
- Alving K, Sundström C, Matran R, Panula P, Hökfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res* 1991;264:529-38.
- Angermayr B, Mejias M, Gracia-Sancho J, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Fernandez M. Heme-oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation and increases VEGF expression in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2006; 44: 1033-9.
- Anower-E-Khuda MF, Habuchi H, Nagai N, Habuchi O, Yokochi T. Heparan sulfate 6-O-Sulfotransferase isoform-dependent regulatory effects of heparin on the activities of various proteases in mast cells and the biosynthesis of 6-O-Sulfated heparin. *J Biol Chem* 2013; 288: 3705-17.



- Annon L, Vingadassalom N, Thévenot N, Prudhomme S, Calmus Y. Primary biliary cirrhosis. *Rev Infirm.* 1989 Dec;39:38-44.
- Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 2008;40:170-80.
- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:G119-27.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer* 2005;104:223-8.
- Arias JI, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. Inflammation and cancer: is trophism the link? *Surg Oncol.* 2006;15:235-42.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer* 2007;6:29.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol* 1997;26:1042-54.
- Arroyo V, Fernandez J, Gines P. Pathogenesis and treatment of hepatorenal síndrome. *Seminars in Liver Disease* 2008; 28: 81-95.
- Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grützkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999;8:1-16.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Zervoudakis G, Filos KS, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Gut regulatory peptides bombesin and neurotensin reduce hepatic oxidative stress and histological alterations in bile duct ligated rats. *Regul Pept* 2004;120:185-93.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg* 2007;31:2023-32.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 2009;15:121-3.

- Au SR, Au K, Saggars GC, Karne N, Ehrlich HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. *J Cell Biochem* 2007;100:1170-7.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci* 2007;52:2601-9.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc* 2004;37:141-8.
- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News* 2009:111-6.
- Azmaiparashvili E, Berishvili E, Kakabadze Z, Pilishvili O, Mikautadze E, Solomonias R, Jangavadze M, Kordzala D. Ductural reaction at the early terms of common bile duct ligation in the rats. *Acta Biol Hung* 2012; 63: 321-32.
- Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:407-25.
- Ball DH, Tay HK, Bell KS, Coates ML, Al-Riyami L, Rzepecka J, Harnett W, Harnett MM. Mast cell subsets and their functional modulation by the *Acanthocheilonema vitae* product ES-62. *J Parasitology Research* 2013;
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:464-71.
- Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. *Lab Invest* 1980; 43: 456-62.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000;127:243-9.
- Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for longterm control of asthma and wheeze in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2004; 1.
- Bartelds B, van Loon RL, Mohaupt S, Wijnberg H, Dickinson MG, Boersma B, Takens J, van Albada M, Berger RM. Mast cell inhibition improves pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Chest* 2012; 141: 651-60.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24:153-66.
- Battaller R, Brenner DA. *Liver fibrosis*. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.

- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23: 235.
- Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int* 2013; *Liver Int*. 2013 Jan;33:31-9. doi: 10.1111/liv.12021. Epub 2012 Nov 4.
- Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11
- Bergheim I, Harsch S, Mueller O, Schimmel S, Fritz P, Stange EF. Apical sodium bile acid transporter and ileal lipid binding protein in gallstone carriers. *J Lipid Res* 2006;47:42-50.
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duvéau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:592-600.
- Beunk L, Verwoerd A, Van Overveld FJ, Rijkers GT. Role of mast cells in mucosal diseases: current concepts and strategies for treatment. *Expert Rev* 2013; 53: 63.
- Bhattacharya A, Ghosal SK. Effect of hydrophobic permeation enhancers on the release and skin permeation kinetics from matrix type transdermal drug delivery system of ketotifen fumarate. *Acta Pol Pharm* 2001;58:101-5.
- Bischofs IB, Schwarz US Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9274-9.
- Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol* 2009;31:185-205.
- Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology* 2004;127:1847-9.
- Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:849-64.
- Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:299-305.
- Bomzon A, Gali D, Better OS, Blendis LM. Reversible suppression of the vascular contractile response in rats with obstructive jaundice. *J Lab Clin Med* 1985;105:568-72.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, Seo SS, Spee B, Van Rooijen N, Sansom OJ, Iredale JP, Lowell S, Roskams T, Forbes SJ. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med* 2012;18:572-9.

- Breyer-Pfaff U, Mey U, Green MD, Tephly TR. Comparative N-glucuronidation kinetics of ketotifen and amitriptyline by expressed human UDP-glucuronosyltransferases and liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2000;28:869-72.
- Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy* 2010;40:42-9.
- Brown MA, Hatfield JK. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: with so much evidence, why is there still controversy? *Frontiers in Immunology* 2012; 3: 1-11.
- Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT, Wagner KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 2008;658:28-41.
- Buob S, Johnston AN, Webster CRL. Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and treatment. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 169-86.
- Byrne SN, Limon-Flores AY, Ullrich SE. Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon UV-irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *J Immunol* 2008; 180: 4648-55
- Cai C, Cao Z, Loughran PA, Kim S, Darwiche S, Korff S, Billiar TR. Mast cells play a critical role in the systemic inflammatory response and end-organ injury resulting from trauma. *J Am Coll Surg* 2011; 213: 604-15.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *J Hepatol* 2004;40:14-23.
- Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123:1323-30.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273-8.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006;5:257-60.
- Cardenas A, Arroyo V. Management of ascites and hepatic hydrothorax. Best Practice and Research: *Clinical Gastroenterology* 2007; 21: 55-75.
- Casella G, Villanacci V, Bassotti G. Eosinophilic ascites resolution with ketotifen. *Mayo Clin Proc* 2011;86:1027.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol* 2002;36:200-9.

- Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 2002;37:527-35.
- Castañeda B, Debernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Pérez-del-Pulgar S, Moitinho E, Pizcueta P, Bosch J. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2000;31:581-6.
- Caughey GH. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol* 2011;716:212-34.
- Caughey GH. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev* 2007; 217: 141-54.
- Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response síndrome in cirrhotic patients: Relationship with their in-hospital outcome. *J Hepatol* 2009; 51: 475-82.
- Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood* 2003 Apr 15;101:2973-82.Epub 2002 Dec 27.
- Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang HC, Lee SD. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest* 2004;34:290-6.
- Chen B, Fu B. A model for charged molecule transport in the interstitial space. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005;1:55-8.
- Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen Nv, Wintermeyer P, Mott S, Gregory SH. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism. *J Hepatol* 2011;54:746-52.
- Chiang CH, Chen JL, Liu YT, Wang DP. Therapeutic effect and pharmacokinetics of ketotifen transdermal delivery system. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24:213-7.
- Chuang YH, Lan RY, Gershwin ME. The immunopathology of human biliary cell epithelium. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 323-31.
- Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 34: 505-95.
- Claman HN. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16:141-51.
- Clements WD, McCaigue M, Erwin P, Halliday I, Rowlands BJ. Biliary decompression promotes Kupffer cell recovery in obstructive jaundice. *Gut* 1996;38:925-31.
- Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut* 1996;39:587-93.

- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut* 1998;42:293-9.
- Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:281-7.
- Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localization of mast cells in tissues. *Trends Immunol* 2011; 32: 478-485.
- Corradi F, Brusasco C, Fernández J, Vila J, Ramirez MJ, Seva-Pereira T, Fernández-Varo G, Mosbah IB, Acevedo J, Silva A, Rocco PR, Pelosi P, Gines P, Navasa M. Effects of pentoxifylline on intestinal bacterial overgrowth, bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites. *Dig Liver Dis* 2012;44:239-44.
- Costa AM, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch* 2003;442:372-80.
- Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: A review. *Comp Med* 2009; 59: 517-26.
- Cuenca J, Martín-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Boscá L, Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol* 2006 Nov;169:1567-76.
- Davis GE. Angiogenesis and Proteinases: Influence on Vascular Morphogenesis, Stabilization and Regression. *Drug Discov Today Dis Models* 2011;8:13-20.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005;26:637-43.
- Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990;30(12 Suppl):S184-9.
- De Jonge WJ, The FO, Van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, van Deventer SJ, van den Wijngaard RM, Boeckstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2004;127:535-45.
- De las Heras N, Aller MA, Revuelta-Lopez E, Baeza G, Cachofeiro V, Arias J, Lahera V. Hipertension portal: desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica asociada a síndrome metabólico. *Clin Invest Arterioscl* 2011
- Desmet VJ. The amazing universe of hepatic microstructure. *Hepatology* 2009; 50: 333-44.
- Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch* 2011; Mar;458:251-9. doi: 10.1007/s00428-011-1048-3. Epub 2011 Feb 2.

- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1997;76:765-78.
- Dichlberger A, Kovanen PT y Schneider WJ Mast cells:lipid droplets to lipid mediators Clin Science 2013;125:121-130
- Diehl AM. Neighborhood watch orchestrates liver regeneration. *Nat Med* 2012;18:497-9.
- Diez-Arias JA, Aller MA, Palma MD, Arias JL, Muñoz E, Sánchez M, Arias J. Increased duodenal mucosa infiltration by mast cells in rats with portal hypertension. *Dig Surg* 2001;18:34-40.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8:445-54.
- Dold S, Laschke MW, Zhau Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res* 2010;59:291-8.
- Dong X, Geng Z, Zhao Y, Chen J, Cen Y. Involvement of mast cell chymase in burn wound healing in hamsters. *Exp Therap Med* 2013; 5: 643-7.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1134-46.
- Doumas BT, Wu TW, Poon KC, Jendrzczak B. Chemical nature of a synthetic bilirubin conjugate and its reactivities in the total and direct reactions by the Jendrassik-Gróf method. *Clin Chem* 1985;31:1677-82.
- Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA. Murine model of wound healing. *JVis Exp* 2013 May 28;.doi:10.3791/50265.
- Egan CA, Rallis TM. Treatment of chronic urticaria with ketotifen. *Arch Dermatol* 1997;133:147-9.
- El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to small cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006; 176: 1860-8.
- Erlinger S. Ductal plate malformations: A morphogenetic classification based on genetic defects. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 604-606.



- Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol* 2011;670:180-5.
- Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1351-65.
- Fahy JV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 546-51.
- Farha S, Sharp J, Asosingh K, Park M, Comhait SAA, Tang WHW, Thomas J, Farver C, Hsien E, Loyd JE, Erzurum SC. Mast cell number, phenotype and functions in human pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2012; 2: 220-8.
- Fallerell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995; 22: 1175-81.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology* 1995;22:1175-81.
- Fernandez-Blanco JA, Hollenberg MD, Martinez V, Vergara P. PAR-2-mediated control of barrier function and motility differs between early and late phases of postinfectious gut dysfunction in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 304: G390-400.
- Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; 126: 886-94.
- Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-PaganR, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamicsplanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factorand platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology*2007; 47: 1208-17.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-20.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 58 : 49-58.
- Ferrán Aranaz, M. SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico. Mc Graw Hill. 1996.
- Feuser K, Thon K-P, Bischoff SC, Lorentz A. Human intestinal mast cells area a potent source of multiple chemokines. *Cytokine* 2012; 1822: 85-92.
- Ford AC, Talley NJ. IBS in 2010: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:76-8.



- Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 2011;92:143-50.
- Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Song XY, Guarner C, Such J. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007;46:797-803.
- Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci* 2006;51:2248-56.
- Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Dig Liver Dis* 2010;42:529-36.
- Frenzel L, Hermine O. Mast cells and inflammation. *J Bone Spine* 2013; 80: 141-5.
- Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology*. 2008;254:120-9.
- Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2011 Dec;56:544-9. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.030. Epub 2011 Sep 14. Review
- Gallant-Behm CL, Hildebrand KA, Hart DA. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. *Wound Repair Regen* 2008;16:226-33.
- Galli SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990;62:5-33.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:135-42.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-86.
- Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 454: 445-54.
- Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18: 693-704.
- Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:237-46.
- García-Domínguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th(2) and Th(1) cytokine redistribution in microsurgical cholestatic rats. *J Surg Res* 2010;162:203-12.

- García-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gómez MA, Marti;n FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res* 2002;24:275-281.
- Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17:1081-5.
- Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-72.
- Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996;110:199-209.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 1996;111:1118-24.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:307-17.
- Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008;89:251-63.
- Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006;130:810-22.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003;38:345-54.
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:1147-54.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 2008;95:646-56.
- Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 2011;138:4569-83.

- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005;11:337-45.
- Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 2003;60:608-16.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:7.
- Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:297-305.
- Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neurotrophils but much more. *Front Immunol* 2012; 3: 402.
- Gordon JR, Galli SJ. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;180:2027-37.
- Gossard AA. Care of the cholestatic patient. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 331-44.
- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM. Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs* 1990;40:412-48.
- Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice-mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1853-71.
- Greiner JV, Mundorf T, Dubiner H, Lonsdale J, Casey R, Parver L, Kapik BM, Shams NB, Abelson MB. Efficacy and safety of ketotifen fumarate 0.025% in the conjunctival antigen challenge model of ocular allergic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2003;136:1097-105.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007;6:7.
- Gri G, Frossi B, D'Inca F, Danelli L, Betto E, Mion F, Sibilano R, Pucillo C. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Frontiers in Immunology* 2012; 3: 1-11.
- Grizzi F, Franceschini B, Gagliano N, Moscheni C, Annoni G, Vergani C, Hermonat PL, Chiriva-Internati M, Dioguardi N. Mast cell density, hepatic stellate cell activation and TGF- $\beta$ 1 transcripts in the aging Sprague-Dawley rat during early acute liver injury. *Toxicol Pathol* 2003; 31: 173-8.

- Grizzi F, Di Caro G, Laghi L, Hermonat P, Mazzola P, Nguyen DD, Radhi S, Figueroa JA, Cobos E, Annoni G, Chiriva-Internati M. Mast cells and the liver aging process. *Immunity and Ageing* 2013; 10: 9.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5:147-53.
- Grützka A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwartz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A. Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: Implications for the biological significance of VEGF. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 875-84
- Guerrero S, Muñiz E, Teijón C, Olmo R, Teijón JM, Blanco MD. Ketotifen-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers: characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Sci* 2008;97:3153-69.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2003;38:355-63.
- Guo S, Di Pietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219-29.
- Gurish MF, Boyce JA. Mast cells: ontogeny, homing and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1285-91.
- Gupta S, Morgan TR, Gordan GS. Calcitonin gene-related peptide in hepatorenal syndrome. A possible mediator of peripheral vasodilation? *J Clin Gastroenterol* 1992;14:122-6.
- Haenisch B, Nöthen MM, Molderings GJ. Systemic mast cell activation disease: the role of molecular genetic alterations in pathogenesis, heritability and diagnostic. *Immunology* 2012; 137: 192-205.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabejdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol* 2004;499:307-13.
- Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* 2007;217:8-18.
- Hallgren J, Gurish HF. Mast cell progenitor trafficking and maturation. *Adv Exp Med Biol* 2011; 716: 14-28.
- Halova I, Draberova L, Draber P. Mast cell chemotaxis-chemoattractants and signaling pathways. *Frontiers in Immunol* 2012; 3: 1-16.

- Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, Meza YG, Williams CS, Ruth MC, McCuskey RS, Dvorak B. Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G695-G702.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology* 1999;30:1198-205.
- Hart SP, Dransfield I. Activation of human lung mast cells by monomeric immunoglobulin E. *Eur Respir J* 2005;26:744-5.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery* 2005;138:313-20.
- Harunari N, Armendariz R, Zhu KQ, Deubner H, Engrav LH, Muangman P, Carrougher GJ, Gibran NS. Comparison of collagen nodules and mast cells between human hypertrophic scar and thick scar in the female red duroc pig. *Wound Repair Regen* 2005;13: 27.
- Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:729-38.
- He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:309-18.
- Hei ZQ, Gan XL, Huang PJ, Wei J, Shen N, Gao WL. Influence of Ketotifen cromolyn sodium and compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 42.
- Heinrich S, Georgiev P, Weber A, Vergopoulos A, Graf R, Clavien P-A. Partial bile duct ligation in mice: A novel model of acute cholestasis. *Surgery* 2011 Mar;149:445-51. doi: 10.1016/j.surg.2010.07.046.
- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:265-80.
- Henry RJ, Golub OJ, Sobel C. Some of the variables involved in the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis. *Clin Chem* 1957;3:49-64.
- Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* Fourth Edition. Edit. Elsevier Saunders. St.Louis. Missouri. USA. 2006, pp1165 –1208.
- Hildebrand KA, Zhang M, Hart DA. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in posttraumatic contractures. *Clin Orthop Relat Res* 2007;456:85-91.

- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology* 2010;139:1481-96.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12: 861-2.
- Hosaka K, Rayner SE, Von der Weid PY, Zhao J, Imtiaz MS, Van Helde DF. Calcitonin gene-related peptide activates different signaling pathways in mesenteric lymphatics of guinea pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H813-22.
- Hosoda Y, Miyano T, Fujimoto T. Assay of gamma-glutamyl-transpeptidase activity in amniotic fluid offers a possible prenatal diagnosis of biliary atresia in the rat model. *Prenat Diagn* 1997; 17: 9-12.
- Huang YT, Hsu YC, Chen J, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci* 2003;10:170-8.
- Huang LT, Chen CC, Sheen JM, Chen YJ, Hsieh CS, Tain YL. The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci* 2010;28:169-74.
- Huang P, Liu D, Gan X, Zhang R, Gao W, Xia Z, Hei Z. Mast cells activation contribute to small intestinal ischemia reperfusion induced acute lung injury in rats. *Injury* 2012;43:1250-6.
- Huber M. Activation/inhibition of mast cells by supr-optimal antigen concentrations. *Communication and Signaling* 2013;11: 7.
- Hung CH, Suen JL, Hua YM, Chiang W, Chang HC, Chen CN, Jong YJ. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:378-84.
- Huntley JF, Mackellar A, Newlands GF, Irvine J, Miller HR. Mapping of the rat mast cell granule proteinases RMCPI and II by enzyme-linked immunosorbent assay and paired immunofluorescence. *APMIS*. 1990 Oct;98 :933-44.
- Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1873-80.
- Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery* 2010;148:477-89.
- Ikeda R, Michitaka K, Yamauchi Y, Matsui H, Onji M. Changes in gastrointestinal lymph and blood vessels in patients with cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol* 2001;36:689-95.

- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-410.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005;128:138-46.
- Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg* 1984;147:766-71.
- Inoue K, Ogawa K, Okada J, Sugibayashi K. Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug. *J Control Release* 2005;108:306-18.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;117:539-48.
- Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1318-28.
- Iwakiri Y, Grosszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver disease: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006; 43: S121-31.
- Jacob G, Nassar N, Hayam G, Ben-Haim S, Edoute Y, Better OS, Bomzon A. Cardiac function and responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in rats with obstructive jaundice. *Am J Physiol* 1993;265:G314-20.
- Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee P, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS. Acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2012; 57: 1336-48.
- Jensen F, Woudwyk M, Teles A, Woidacki K, Taran F, Costa S, Malfertheiner SF, Zenclussen AC. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLOS ONE* 2010; 5: e14409.
- Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:869-77.
- Jeong D-H, Lee G-P, Jeong W-I, Do S-H, Yang H-J, Yuan D-W, Park H-Y, Kim K-J, Jeong K-S. Alterations of mast cells and TFF- $\beta$ 1 on the silymarin treatment for CCL<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1141-8
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 435-61.



- Jones NL, Roifman CM, Griffiths AM, Sherman P. Ketotifen therapy for acute ulcerative colitis in children: a pilot study. *Dig Dis Sci* 1998;43:609-15.
- Joubert CJ. Principles of care and management in a laboratory animal facility. *J S Afr Vet Assoc* 1978;49:153-4.
- Jungfer B, Jansen T, Przybilla B, Plewig G. Solid persistent facial edema of acne: successful treatment with isotretinoin and ketotifen. *Dermatology* 1993;187:34-7.
- Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altioek M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol* 2010;16:4313-20.
- .Karp CL, Murray PJ. Non-canonical alternatives: What a macrophage is 4. *J Experimental Medicine* 2012; 209: 427-31.
- Kassel KM, Sullivan BP, Luyendyk JP. Lipopolysaccharide enhances transforming growth factor  $\beta$ 1-induced platelet-derived growth factor-B expression in bile duct epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:714-21.
- Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nihon Med Sch* 2005;72:217-25.
- Kaur R, O'Shaughnessy CT, Jarvie EM, Winchester WJ, McLean PG. Characterization of a calcitonin gene-related peptide release assay in rat isolated distal colon. *Arch Pharm Res* 2009;32:1775-81.
- Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med* 2007; 42 : 1278-89.
- Kennedy S, Wu J, Wadsworth RM, Lawrence CE, Maffia P. Mast cells and vascular diseases. *Pharmacol and Therap* 2013; 138: 53-65.
- Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003;2:159-63.
- Kidd M, McKenzie SH, Steven I, Cooper C, Lanz R; Australian Ketotifen Study Group. Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1206-11.
- Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg* 2008;195:249-56.
- Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:5-7.



- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d496-503.
- Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res* 2010;164:221-7.
- Kischer CW, Bailey JF. The mast cell in hypertrophic scars. *Tex Rep Biol Med* 1972;30:327-38.
- Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010;59:1213-21.
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010;337:77-81.
- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2004;115-116:63-75.
- Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res* 2012;110:174-89.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:7413-20.
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1668-76.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-11
- Kramer HJ Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron* 1997;77:1-12
- Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Apr;290:G765-71. Epub 2005 Nov 10
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006;87:343-59.
- Kupietzky A, Levi-Schaffer F. The role of mast cell-derived histamine in the closure of an in vitro wound. *Inflamm Res* 1996;45:176-80.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003;18:65-70.

- Laschke MW, Dold S, Jeppsson B, Schilling MK, Menger MD, Thorlacius H. Rho-kinase inhibitor attenuates cholestasis-induced CXC chemokine formation, leukocyte recruitment, and hepatocellular damage in the liver. *J Surg Res* 2010;159:666-73.
- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc* 1983;42:1662-6.
- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004;127:1565-77.
- Le Bigot JF, Cresteil T, Kiechel JR, Beaune P. Metabolism of ketotifen by human liver microsomes. In vitro characterization of a tertiary amine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 1983;11:585-9.
- Le Bigot JF, Begue JM, Kiechel JR, Guillouzo A. Species differences in metabolism of ketotifen in rat, rabbit and man: demonstration of similar pathways in vivo and in cultured hepatocytes. *Life Sci* 1987;40:883-90.
- Lee YS, Vijayasingam S. Mast cells and myofibroblasts in keloid: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *Ann Acad Med Singapore* 1995;24:902-5.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:195-206.
- Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Kim YM. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf1/MED/ERK and PI3K/AKT/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2836-46.
- Leonhardt J, Kuebler JF, Turowski C, Tschernig T, Geffers R, Petersen C. Susceptibility to experimental biliary atresia linked to different hepatic gene expression profiles in two mouse strains. *Hepatol Res* 2010; 40: 196-203.
- Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology* 1993;17:908-14.
- Levi-Schaffer F, Rubinchik E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 999-1003.
- Lewis A, Wan J, Baothman B, Monk PN, Suvarna SK, Peachell PT. Heterogeneity in the responses of human lung mast cells to stem cell factor. *Clin Exper Allergy* 2012; 43: 50-59.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004;24:21-42.
- Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2005;11:6079-84.

- Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc* 2007;39:3424-8.
- Limon-Flores AY, Chacon-Salinas R, Ramos G, Ulrich SE. Mast cells mediated the immune suppression induced by dermal exposure to JP-8 jet fuel. *Toxicolo Sci* 2009; 112: 144-52.
- Lindahl U, Kjellen L. Pathophysiology of heparin sulphate: many diseases, few drugs. *J Intern Med* 2013; doi: 10-1111/joim 12061.
- Lipsett PA, Pitt HA. Acute cholangitis. En: Biliary Tract Surgery. Ed. Pitt HA. *Surgical Clinical of North America* 1990; 70: 1297-312.
- Liu Z, Sakamoto T, Yokomuro S, Ezure T, Subbotin V, Murase N, Contrucci S, Demetris AJ. Acute obstructive cholangiopathy in interleukin-6 deficient mice: compensation by leukemia inhibitory factor (LIF) suggests importance of gp-130 signaling in the ductular reaction. *Liver* 2000;20:114-24.
- Llamas MA, Aller MA, Marquina D, Nava MP, Arias J. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes increases in chronic portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci* 2010;55:2244-54.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38:191-208.
- Lojek A, Cíž M, Pekarová M, Ambrožová G, Vašíček O, Moravcová J, Kubala L, Drábiková K, Jančinová V, Perečko T, Pečivová J, Mačičková T, Nosál R. Modulation of metabolic activity of phagocytes by antihistamines. *Interdiscip Toxicol* 2011;4:15-9.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91: 365-73.
- Lopez-Font I, Gea-Sorlí S, de-Madaria E, Gutiérrez LM, Pérez-Mateo M, Closa D. Pancreatic and pulmonary mast cells activation during experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010;16:3411-7.
- Lorente L, Aller MA, Duran HJ, Cejalvo D, Lloris JM, Arias J. Extrahepatic biliary anatomy in Wistar rats. *Surg Res Comm* 17: 31-38, 1995.
- Lorente L, Aller MA, Arias J. Liver Anatomy. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA, Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers, 2009, pp 99-107.
- Lu BR, Mack CL. Inflammation and biliary tract injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 260-4.

- Lu BR, Brindley SM, Tucker RM, Lambert CL, Mack CL. Alpha-enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. *Gastroenterology* 2010; 139: 1753-61.
- Ma C, Brunt EM. Histopathologic evaluation of liver biopsy for cirrhosis. *Adv Anat Pathol* 2012; 19: 220-30.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol* 2010;159:950-7.
- Mani AR, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour AR. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:905-8.
- Mannon P, Reinisch W. Interleukin 13 and its role in gut defense and inflammation. *Gut* 2013; 61: 1765-73.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:519-31.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006;11:1696-701.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-44.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasions. *Physiol Rev*.2003;83:337-376.
- Martin U, Roemer D. Ketotifen: a histamine release inhibitor. *Monogr Allergy* 1977;12:145-9.
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta*. 1966;13: 161-70.
- Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinzy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128:121-37.
- Marzioni M, Francis H, Benedetti A, Ueno Y, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Mancino MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca<sup>2+</sup>-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 2006;168:398-409.
- Marzioni M, Alpini G, Saccomanno S, Candelaresi C, Venter J, Rychlicki C, Fava G, Francis H, Trozzi L, Glaser S, Benedetti A. Glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist exendin-4 modulate cholangiocyte adaptive response to cholestasis. *Gastroenterology* 2007;133:244-55.

- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158:2079-88
- Matsumoto Y, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A, Torigoe K. Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:360-6.
- Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1923-32.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000;20:152-6.
- Mejias M, Garcia-Pras E, Gallego J, Mendez R, Bosch J, Fernandez M. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol* 2010; 52: 529-39.
- Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2011;92:158-67.
- Merino J, Aller MA, Rubio S, Arias N, Nava MP, Loscertales M, Arias J, Arias JL. Splanchnic-brain crosstalk mediated by chemokines in portal hypertensive rats. *The Int J Gastroenterol* 2009; 7: 2.
- Merino J, Aller MA, Rubio S, Arias N, Nava MP, Los Certales M, Arias J, Arias JL. Gut-brain chemokine changes in portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 2309-17.
- Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007;28:234-41.
- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:304-28.
- Migalovich-Sheikhet H, Friedman S, Mankuta D, Levi-Schaffer F. Novel identified receptors on mast cells. *Front Immunol* 2012; 3: 238.
- Mihun ZM, Kuftinec J, Hofman H, Zinic M, Kajfez F. "Ketotifen," En: *Analytical Profiles of Drug Substances, vol. 13, p.240, Elsevier, 1984.*
- Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* 2005;138:236-45.
- Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, Wang T, Hu B, Arbabi S, Hemmila MR, Wang SC, Remick DG, Su GL. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality

- in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G45-54.
- Miñano C, García-Tsao G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 681-95.
- Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol.* 1997 Dec;108:652-7.
- Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol* 2001;158:967-75.
- Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg* 2002;194:731-9.
- Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitroergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology* 2006;13:227-32.
- Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile duct-ligated rat. *Pathophysiology* 2006;13:111-7.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen fumarate lessens contracture severity and myofibroblast hyperplasia: a study of a rabbit model of posttraumatic joint contractures. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:1468-77.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen reduces joint capsule fibrosis in a rabbit model of post-traumatic joint contractures. *Inflamm Res* 2012;61:285-92.
- Mookerjee RP. Acute-on-chronic liver failure: the liver and portal haemodynamics. *Curr Opin Critical Care* 2011; 17: 170-6.
- Moquillaza LM, Aller MA, Nava MP, Santamaría L, Vergara P, Arias J. Partial hepatectomy, partial portal vein stenosis and mesenteric lymphadenectomy increase splanchnic mast cell infiltration in the rat. *Acta Histochem* 2010;112:372-82.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013 Mar 6. pii: S0016-5085. 00291-6. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.042.

- Mori V, Bartoloni St Omer F. On the behavior of mast cells in experimental cholestatic hepatopathy caused by ligation of the common bile duct. *Arch De Vecchi Anat Patol* 1966;47:1089-98.
- Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L, Eutamene H. Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock* 2007;28:118-24
- Morgan WWJr, Rosenkrantz JC, Hill RBJr. Hepatic arterial interruption in the fetus. An attempt to stimulate biliary atresia. *J Pediatr Surg* 1966; 1: 342-6.
- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* 2011;193:225-31.
- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54:367-74.
- Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis* 1999;3:465-75.
- Moyer KE, Saggars GC, Ehrlich HP. Mast cells promote fibroblast populated collagen lattice contraction through gap junction intercellular communication. *Wound Repair Regen* 2004;12:269-75.
- Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:695-714.
- Murray M, Zaluzny L, Farrell GC. Impaired androgen 16 alpha-hydroxylation in hepatic microsomes from carbon tetrachloride-cirrhotic male rats. *Gastroenterology*. 1987 Jul;93:141-7.
- Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol* 2001;411:135-141.
- Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997;17:35-47.
- Nakamura A, Yamazaki K, Suzuki K, Sato S. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:2245-9.
- Nakamura K, Tanoue A. Etiología of biliary atresia as a developmental anomaly: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 Apr 9.
- Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30:934-43.



- Nelson L, Vergnolle N, D'Mello C, Chapman K, Le T, Swain MG. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *J Hepatol* 2006;44:1141-9.
- Neumann K, Kruse N, Szilagyi B, Erben U, Rudolph C, Flach A, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K. Connecting liver and gut: Murine liver sinusoidal endothelium induces gut tropism of CD4<sup>+</sup> T cells via retinoic acid. *Hepatology* 2012; 55: 1976-84.
- Newby DE, Hayes PC. Hyperdynamic circulation in liver cirrhosis: not peripheral vasodilatation but "splanchnic steal". *Q J Med* 2002; 95: 827-30.
- Ng, CP, Swartz MA. Mechanisms of Interstitial Flow-Induced Remodeling of Fibroblast-Collagen Cultures. *Ann Biomed Engin* 2006; 34: 446-454.
- Nienartowicz A, Sobaniec-Lotowska ME, Jarocka-Cyrta E, Lemancewicz D. Mast cell in neoangiogenesis. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA53-56.
- Nishikawa Y, Sone M, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Yamamoto Y, Ito A, Sugiyama T, Enomoto K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes in vitro. *J Cell Biochem.* 2013 Apr;114:831-43. doi: 10.1002/jcb.24424
- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53:438-45.
- Ogawa T, Suruga K, Kojima Y, Kitahara T, Kuwabara N. Experimental study of the pathogenesis of infantile obstructive cholangiopathy and its clinical evaluation. *J Pediatr Surg* 1983; 18: 131-5.
- Oguz S, Kanter M, Erboga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol* 2012;43:151-9.
- Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol* 1993;17:155-62.
- Oliva A, Multigner L. Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006;85:240-3.
- Olson JC, Wendon JA, Kramer DJ, Arroyo V, Jalan R. Intensive care of the patient with cirrhosis. *Hepatology* 2011; 54: 1864-72.
- Omenetti A, Popov Y, Jung Y, Choi SS, Witek RP, Yang L, Brown KD, Schuppan D, Diehl AM. The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut* 2008;57:1275-82.



- Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008;118:3331-42.
- Omenetti A, Bass LM, Anders RA, Clemente MG, Francis H, Guy CD, McCall S, Choi SS, Alpini G, Schwarz KB, Diehl AM, Whittington PF. Hedgehog activity, epithelial-mesenchymal transitions, and biliary dysmorphogenesis in biliary atresia. *Hepatology* 2011;53:1246-58.
- Omenetti A, Diehl AM. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:268-75.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997;122:281-6.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol* 1997;28:525-9.
- O'Sullivan M. Therapeutic potential of ketotifen in irritable bowel syndrome (IBS) may involve changes in mast cells at sites beyond the rectum. *Gut* 2011;60:423.
- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002;123:1667-76.
- Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 71-8.
- Park SM. The crucial role of cholangiocytes in cholangiopathies. *Gut Liver* 2012; 6: 295-304.
- Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair* 2009; 2: 4.
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008;135:660-70.
- Patwari P, Lee RT. Mechanical control of tissue morphogenesis. *Circ Res* 2008; 103: 234-43.
- Pejler G, Rönnerberg E, Waern I, Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 2010; 115: 4981-90.
- Penissi AB, Rudolph MI, Piezzi RS. Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. *Biocell* 2003;27:163-72.

- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem* 1968;14:1147-59.
- Petersen C. Biliary atresia: the animal models. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21: 185-91.
- Phillips PA, Keast D, Papadimitriou JM, Walters MN, Stanley NF. Chronic obstructive jaundice induced by reovirus type 3 in weaning mice. *Pathology* 1969; 1: 193-203.
- Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 281-90.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000;21:49-98.
- Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH, Panella C, Subbotin V, Carr B, Bouzahzah B, Francavilla A, Starzl TE. Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: Evidence of a specific growth effect on bile duct cells. *Hepatology* 1995; 21: 1070-78.
- Porter LE, Elm MS, Van Thiel DH, Eagon PK. Hepatic estrogen receptor in human liver disease. *Gastroenterology* 1987; Mar;92:735-45.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1381-91.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol* 2000;32:129-40.
- Póvoa P, Ducla-Soares J, Fernandes A, Palma-Carlos AG. A case of systemic mastocytosis; therapeutic efficacy of ketotifen. *J Intern Med* 1991;229:475-7.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1025-31.
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007;6:1.
- Rahimi RS, Rockey DC. Complications and outcomes in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 204-9.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004;84:153-9.
- Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 2004;127:997-1000.

- Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver* 2000;20:387-96.
- Ramos L, Peña G, Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Mast cell stabilization improves survival by preventing apoptosis in sepsis. *J Immunol* 2010;185:709-16.
- Repchinsky C. Up-to-date drug information. *Can Fam Physician* 2001; Aug;47:1545.
- Reynolds BM, Dargan EL. Acute obstructive cholangitis: A distinct clinical syndrome. *Ann Surg* 1959; 150: 299-303. Si..
- Reynoso-Paz S, Coppel RI, Mackay JR, Bass NM, Ansari AA, Gershwin ME. The immunobiology of bile and biliary epithelium. *Hepatology* 1999; 30: 351-7.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 2007;11:176-205.
- Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infection and prognosis. *Hepatology* 1984; 4: 53-8.
- Rioux KP, Wallace JL. Long-term antigen challenge results in progressively diminished mucosal mast cell degranulation in rats. *Gastroenterology* 1996;111:1516-23.
- Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex. Stroke and inflammation: The potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Horm Behav* 2012; Horm Behav. 2013 Feb;63:238-53. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.04.007. Epub 2012 Apr 24.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997;112:269-79.
- Rocha MF, Aguiar JE, Sidrim JJ, Costa RB, Feitosa RF, Ribeiro RA, Lima AA. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on the intestinal secretion induced by cholera toxin. *Toxicon* 2003;42:183-9.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006;10:459-79.
- Rodríguez J. Anestesia. En: *Trasplante experimental de órganos*. Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. Eds. Garsi SA, Madrid, 1989, pp 65-68.
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic Liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27: 535-44.
- Rönnberg E, Melo FR, Pejler G. Mast cell proteoglycans. *J Histochem Cytochem* 2012; Dec;60:950-62. doi: 10.1369/0022155412458927. Epub 2012 Aug 16.

- Roy S, Sen CK. miRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation* 2012; 19: 224-32.
- Ruh J, Vogel F, Schmidt E. In vivo assessment of villous microcirculation in the rat small intestine in indomethacin-induced inflammation: role of mast-cell stabilizer Ketotifen. *Acta Physiol Scand* 2000;170:137-43.
- Rutkowski JM, Swartz MA. A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator. *Trends Cell Biol* 2006; 17: 44-50.
- Saavedra Y, Vergara P. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul Pept* 2003;111:67-75.
- Safyan EL, Veerabagu MP, Swerdlow SH, Lee RG, Rakela J. Intrahepatic cholestasis due to systemic mastocytosis: a case report and review of literature. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1197-200.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology* 2000;118:1157-68.
- Sakamoto T, Kamijima M, Miyake M. Neurogenic airway microvascular leakage induced by toluene inhalation in rats. *Eur J Pharmacol* 2012;685:180-5.
- Sánchez, M., Frutos, G. y Cuesta, P. L. Estadística y matemáticas aplicadas. Editorial Síntesis. 1996.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2008;28:361-6.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Aller MA, Vara E, García C, Nava MP, Arias J. Chronic prehepatic portal hypertension in the rat: is it a type of metabolic inflammatory syndrome? *Lipids Health Dis* 2008a;7:4.
- Sánchez-Patán F, Aller MA, Cuellar C, Rodero M, Corcuera MT, Nava MP, Gómez F, Blanco MD, Guerrero S, Anchuelo R, Muñiz E, Alonso MJ, Teijón JM, Arias J. Mast cell inhibition by ketotifen reduces splanchnic inflammatory response in a portal hypertension model in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2008b;60:347-55.
- Sanchez-Patan F, Anchuelo R, Vara E, Garcia C, Saavedra Y, Vergara P, Cuellar C, Rodero M, Aller MA, Arias J. Prophylaxis with ketotifen in rats with portal hypertension: involvement of mast cell and eicosanoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008 Aug;7:383-94.
- Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN. Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Exp Dermatol* 2012;21:241-8.
- Schaffner F, Popper H. Classification and mechanism of cholestasis. En: *Liver and Biliary Disease*. Pathophysiology, Diagnosis, Management. Editado por Wright R, Alberti

- KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH. London. Oxford: WB Saunders Company Ltd. 1979; 296-323.
- Schemann M, Camilleri M. Functions and imaging of mast cell and neural axis of the gut. *Gastroenterology* 2013; 144: 698-704.
- Schoch C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther* 2003;19:75-81.
- Schwarzer G, Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for long-term control of asthma and wheeze in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2004 :CD001384.
- Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;158:1239-44.
- Seeley EJ, Sutherland RE, Kim SS, Wolters PJ. Systemic mast cell degranulation increases mortality during polymicrobial septic peritonitis in mice. *J Leukoc Biol* 2011;90:591-7.
- Serna H, Porras M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1104-11.
- Sherlock S. Cholestasis. En: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Ed. Sherlock S. Blackwell Scientific Publications. London 1989; 8ª Edición. Chapter 13; pp. 248-272.
- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest* 2004;114:322-9.
- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G575-83.
- Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- $\alpha$  inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2010;90:1447-56.
- Sköld CM, Ohkuni Y, Liu XD, Numerof R, Rennard SI. Co-cultured human mast cells stimulate fibroblast-mediated contraction of collagen gels. *Inflammation* 2001;25:47-51.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990;99:466-77.

- Snoek SA, Dhawan S, van Bree SH, Cailotto C, van Diest SA, Duarte JM, Stanisor OI, Hilbers FW, Nijhuis L, Koeman A, van den Wijngaard RM, Zuurbier CJ, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:172-e91.
- Soucek I, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med* 2007; 13: 1211-1218.
- Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Baloglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:6835-41.
- Spataro AC, Bosmann HB. Mechanism of action of disodium cromoglycate--mast cell calcium ion influx after a histamine-releasing stimulus. *Biochem Pharmacol* 1976;25:505-10.
- Spence JR, Lange AW, Lin SC, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, Whitsett JA, Wells JM. Sox 17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell* 2009; 17: 62-74.
- Spitz L. Ligation of the common bile duct in the fetal lamb: An experimental model for the study of biliary atresia. *Pediatr Res* 1980; 14: 740-8.
- SPSS. SPSS Statistics 19.0 Command Syntax Reference. SPSS Inc. 2010
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 2006;85:699-715.
- Strazzabosco M, Fabris L. Development of the bile duct: Essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol* 2012; 56: 1159-70.
- Suarez V, Puerta A, Santos LE, Perez JM, Varon A, Botero RC. Portal hypertensive biliopathy: A single center experience and literatura review. *World J Hepatol* 2013; 5: 137-44.
- Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *J Hepatol* 1999;30:859-67.
- Sun J, Zhang J, Lindholt JS, Sukhova GK, Liu J, He A, Abrink M, Pejler G, Stevens RL, Thompson RW, Ennis TL, Gurish MF, Libby P, Shi GP. Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2009; 120: 973-82.
- Syal G, Fausther M, Dranoff JA. Advances in cholangiocyte immunobiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G1077-86.

- Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 2007;26:554-60.
- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004;23:752-8.
- Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1538-44.
- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 2007;52:3348-54.
- Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 36: 4-12.
- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol* 2005;56:273-80.
- Tandon B, Garcia-Tsao G. Bacterial infection, sepsis and multiorgan failure in cirrhosis. *Sem Liver Dis* 2008; 28: 26-42.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2006; 82 (2): 258-66.
- Tang S, Lo CY, Lo WK, Chan TM. Resolution of eosinophilic peritonitis with ketotifen. *Am J Kidney Dis* 1997;30:433-6.
- Thabut D, Tazi KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller M, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guichard C, Ogier-Denis E, Poynard T, Moreau R, Lebrec D. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 2007;46:1893-906.
- Thabut D, Massard J, Gangloff A, Carbonell N, Francoz C, Nguyen-Khac E, Duhamel C, Lebrec D, Poynard T, Moreau R. Model for end-stage liver disease score and systemic inflammatory response are major prognostic factors in patients with cirrhosis and acute functional renal failure. *Hepatology* 2007; 46: 1872-82.
- The FO, Buist MR, Lei A, Bennink RJ, Hofland J, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. The role of mast cell stabilization in treatment of postoperative ileus: a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2257-66.



- Theoharides TC, Bondy PK, Tsakalos ND, Askenase PW. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature* 1982;297(5863):229-31.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:21-33.
- Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H. Development of an experimental model of cholestasis induced by hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol* 2011;46:639-47.
- Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:e34-43.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 1092-7.
- Valent P. Mast cell activation syndromes: definition and classification. *Allergy*. 2013 Apr;68(4):417-24. doi: 10.1111/all.12126. Epub 2013 Feb 15
- Valent P, Sillaber C, Baghestanian M, Bankl HC, Kiener HP, Lechner K, Binder BR. What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis? *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115:2-8.
- Van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol* 2006;44:947-55.
- Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 2007;133:91-103.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest* 2010;90:1558-72.
- Venkatanarasimha N, Thomas R, Armstrong EM, Shirley JF, Fox BM, Jackson SA. Imaging features of ductal plate malformations in adults. *Clin Radiol* 2011; 66: 1086-93.
- Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007;43:1-57.
- Vliagoftis H, Befus AD. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005;206:190-203.
- Vliagoftis H, Befus AD. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med* 2005;5:573-89.



- Wakabayashi Y, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Mechanism of neutrophil accumulation in sinusoids after extrahepatic biliary obstruction. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1179-83.
- Walker M, Harley R, LeRoy EC. Ketotifen prevents skin fibrosis in the tight skin mouse. *J Rheumatol* 1990;17: 57-9.
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2007;560: 61-8.
- Wang CC, Lin JW, Lee LM, Lin CM, Chiu WT, Pai HT, Hung KS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene transfer attenuates inflammation after bile duct ligation in the rat. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 556-63.
- Wang J, Shi GP. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:919-24.
- Waynforth HB, Flecknell PA. Anaesthesia and postoperative care. In: Waynforth HB, Flecknell PA, editors. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. London. Elsevier Academic Press. 2004;pp 100-152.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;61:233-45.
- Weller PF, Bubley GJ. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood* 1994; 83: 2759-79.
- White JR, Ishizaka T, Ishizaka K, Sha'afi R. Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3978-82.
- Wiest R, Rath HC Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003 Jun;17:397-425.
- Winau F, Quack C, Darmon A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 2008;20:68-74.
- Woerly G, Loiseau S, Loyens M, Schoch C, Capron M. Inhibitory effects of ketotifen on eotaxin-dependent activation of eosinophils: consequences for allergic eye diseases. *Allergy* 2003;58:397-406.
- Woidacki K, Popovic M, Metz M, Schumacher A, Linzke N, Teles A, Poirier F, Fest S, Jensen F, Rabinovich GA. Mast cells rescue implantation defects caused by c-Kit deficiency. *Cell Death Dis* 2013; 4: e462

- Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis* 1993;13:261-75.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006;12:3553-63.
- Xu JM, Shi GP. Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr Rev* 2012;33:71-108.
- Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010;411:1570-9.
- Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol* 2011;23:415-20.
- Yamashiro T, Watanabe N, Yokoyama KK, Koga C, Tsuruo T, Kobayashi Y. Requirement of expression of P-glycoprotein on human natural killer leukemia cells for cell-mediated cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 1998 May 1;55:1385-90.
- Yang W, Benjamin IS, Moore K, Portmann B, Alexander B. The action of nitric oxide on hepatic haemodynamics during secondary biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Pharmacol* 2003;461:41-8.
- Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression. *Gastroenterology* 2011;141:378-88.
- Yönetçi N, Oruç N, Özütemiz AO, Celik HA, Yüce G. Effects of mast-cell stabilization in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 2001;29:163-71.
- Yukselen V, Karaoglu AO, Ozutemiz O, Yenisey C, Tuncyurek M. Ketotifen ameliorates development of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Pediatr Surg Int* 2004;20:429-33.
- Yung S, Chan TM. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int* 2007;27:S104-9.
- Zandieh A, Payabvash S, Pasalar P, Morteza A, Zandieh B, Tavangar SM, Dehpour AR. Gadolinium chloride, a Kupffer cell inhibitor, attenuates hepatic injury in a rat model of chronic cholestasis. *Hum Exp Toxicol* 2011;30:1804-10.
- Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-74.
- Zhang B, Alysandratos KD, Angelidou A, Asadi S, Sismanopoulos N, Delivanis DA, Weng Z, Miniati A, Vasiadi M, Katsarou-Katsari A, Miao B, Leeman SE, Kalogeromitros Human mast cell degranulation and preformed TNF secretion require mitochondrial translocation to exocytosis sites: relevance to atopic dermatitis. D, Theoharides TC. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jun;127:1522-31.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.005. Epub 2011 Mar 31.

- Zhang B, Asadi S, Weng Z, Sismanopoulos N, Theoharides TC. Stimulated human mast cells secrete mitochondrial components that have autocrine and paracrine inflammatory actions. *PLoS One* 2012; 7: e49767.
- Zhang J, Sun J, Lindholt JS, Sukhova GK, Sinnamon M, Stevens RL, Adachi R, Libby P, Thompson RW, Shi GP. Mast cell tryptase deficiency attenuates mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circ Res* 2011; 108: 1316-27.
- Zhang J, Shi GP. Mast cells and metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:14-20.
- Zhao XJ, McKerr G, Dong Z, Higgins CA, Carson J, Yang ZQ, Hannigan BM. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but no lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax* 2001; 56: 205-11.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol* 2010; 28: 445-89.
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol* 1999;30:646-52.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem* 2010;17:3751-68
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G798-805.